



universität
wien

DIPLOMARBEIT

„Kardiovaskuläre und spasmolytische Aktivität einer neu synthetisierten Testsubstanz (SWS95HCl) an isolierten Organen von Meerschweinchen“

Verfasserin

Natalie Enders

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian Studenik

„Lernen ist wie ein Rudern gegen den Strom.

Hört man damit auf, treibt man zurück.“ - Laotse

Danksagung

Diese Diplomarbeit ist meinen Eltern, Markus und Mathias gewidmet. Danke, dass ihr an mich glaubt und immer für mich da seid!

Ich möchte mich auf diesem Wege auch bei all jenen Menschen bedanken, die ich im Laufe meines Studiums an der Universität kennengelernt habe und die mich durch die Höhen und Tiefen des Studiums begleitet haben. Viele von ihnen darf ich mittlerweile nicht nur als Kollegen, sondern auch als Freunde bezeichnen.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinem Ao. Univ. Prof. Dr. Christian Studenik aussprechen, der mich nach bestem Wissen und mit besonderer Motivation als Betreuer dieser Arbeit geführt hat.

Ebenso gilt mein Dank der Arbeitsgruppe des Departments für Medizinische Chemie und Pharmazeutische Chemie, stellvertretend sei Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker genannt, die für die Synthese und Bereitstellung meiner Testsubstanz verantwortlich waren.

Danke

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Schwefelwasserstoff – H₂S	1
1.1.1 Eigenschaften.....	1
1.1.2 Herstellung	2
1.1.3 Vergiftungsmöglichkeiten	2
1.1.4 Wirkmechanismus	3
1.1.5 Physiologische Bedeutung	3
1.2 Muskelgewebe.....	4
1.2.1 Skelettmuskulatur	5
1.2.2 Glatte Muskulatur	5
1.2.3 Herzmuskulatur	6
2 Ziel der Diplomarbeit	7
3 Material und Methodik.....	8
3.1 Versuchstiere	8
3.2 Isolierung und Präparation der Organe.....	9
3.2.1 Atrium cordis dextrum.....	10
3.2.2 Musculus papillaris	11
3.2.3 Arteria pulmonalis.....	12
3.2.4 Terminales Ileum.....	12
3.2.5 Aorta descendens	13
3.3 Physiologische Nährstofflösung und Begasung.....	14
3.4 Versuchsapparaturen.....	16
3.4.1 Apparatur 1	17
3.4.2 Apparatur 2	20
3.4.3 Der Kraftwandler	22
3.4.4 Die Gasversorgung	23
3.4.5 Das Wasserbad.....	23
3.5 Versuchsablauf	24
3.5.1 Die Testsubstanz – SWS95HCl.....	24
3.5.2 Kaliumchlorid-Lösung zur Vorkontraktion	26
3.5.3 Versuchsablauf am rechten Vorhof.....	27
3.5.4 Versuchsablauf am Papillarmuskel.....	28
3.5.5 Versuchsablauf an der Aorta	29

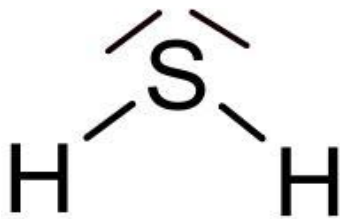
3.5.6 Versuchsablauf an der Pulmonalarterie	30
3.5.7 Versuchsablauf am terminalen Ileum.....	30
3.5.8 Versuchsablauf am terminalen Ileum unter dem Einfluss von Glibenclamid	31
3.5.9 Glibenclamid - Verwendete Substanz zur Untersuchung des Wirkmechanismus..	31
3.6 Auswertung der Versuchsreihen.....	33
3.6.1 Atrium dexter	33
3.6.2 Musculus papillaris	33
3.6.3 Aorta descendens, Arteria pulmonalis, terminales Ileum	34
3.7 Statistik.....	35
4 Ergebnisse	36
4.1 Ergebnisse der Testsubstanz SWS95HCl	36
4.1.1 Darm	36
4.1.2 Pulmonalarterie	39
4.1.3 Rechter Vorhof	42
4.1.4 Aorta	45
4.1.5 Papillarmuskel.....	48
4.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von SWS95HCl am terminalen Ileum	51
4.2.1 Effekt von SWS95HCl unter dem Einfluss von Glibenclamid 30µmol/l.....	51
4.2.2 Effekt von SWS95HCl unter dem Einfluss von Glibenclamid 100µmol/l.....	55
5 Diskussion	58
5.1 Allgemeines.....	58
5.2 Wirkung auf die Herzmuskulatur.....	58
5.2.1 Rechter Vorhof	59
5.2.2 Papillarmuskel.....	59
5.3 Wirkung auf glattemuskuläre Organe.....	60
5.3.1 Aorta	60
5.3.2 Pulmonalarterie	61
5.3.3 Darm	61
5.3.4 Darm und Glibenclamid	62
6 Zusammenfassung.....	63
7 Literaturverzeichnis.....	65
8 Curriculum Vitae	67

1 Einleitung

1.1 Schwefelwasserstoff – H₂S

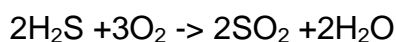
1.1.1 Eigenschaften

Abbildung 1: Struktur von Schwefelwasserstoff



Schwefelwasserstoff wird auch als Dihydrogensulfid, Monosulfan oder Hydrogenium sulfuratum bezeichnet (Hunnius 2004).

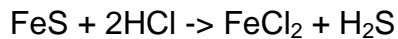
Durch Vereinigung von Schwefel und Wasserstoff entsteht Schwefelwasserstoff (H₂S). Diese Verbindung besteht aus zwei Wasserstoffmolekülen und einem Schwefelmolekül. Dabei handelt es sich um ein farbloses, brennbares, sehr giftiges Gas, das eine geringe Wasserlöslichkeit aufweist. Als schwache, zweibasige Säure bildet es in wässriger Lösung zwei Reihen von Salzen: Sulfide und Hydrogensulfide (Hunnius). Weiters ist H₂S ein mittelstarkes Reduktionsmittel und verbrennt an der Luft mit blauer Flamme zu Schwefeldioxid (SO₂) und Wasser (Ehlers 2003):



Es ist ein systemisch wirksames Gas, das intensiv nach faulen Eiern riecht. H₂S entsteht sowohl bei reduktiver Zersetzung von Eiweiß als auch bei der Einwirkung von Säuren auf Schwermetallsulfide. Große Mengen entstehen in Ställen bei Massentierhaltung und es kommt in Gehalten bis zu 10 % als Bestandteil von Erdgas vor. In der Umwelt ist Schwefelwasserstoff bei der Fäulnis organischer Stoffe, in vulkanischen Gasen und in Mineralquellen zu finden.

H₂S findet vor allem in der qualitativen und quantitativen Analyse Anwendung (Ehlers 2003).

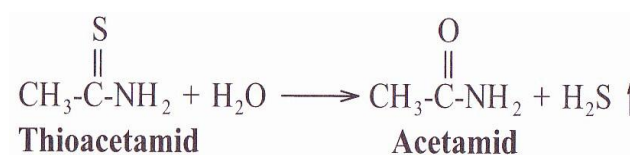
1.1.2 Herstellung



Um Schwefelwasserstoff herzustellen, muss Eisen(II)-sulfid mit einer starken Säure (Salzsäure) behandelt werden. Als Nebenprodukt entsteht Eisen(II)-chlorid (Ehlers 2003).

Eine weitere Methode zur Gewinnung von Schwefelwasserstoff ist die Hydrolyse von Thioacetamid.

Abbildung 2: Gewinnung von H₂S



Aus Thioacetamid entsteht Acetamid und Schwefelwasserstoff. (Ehlers 2003)

1.1.3 Vergiftungsmöglichkeiten

Bei Schwefelwasserstoff handelt es sich um eine stark toxische Verbindung, die beispielsweise zu Vergiftungen in Laboratorien, im Gewerbe und vor allem bei Kanalreinigungen führen kann. Es blockiert in höheren Konzentrationen die Geruchsrezeptoren, was sehr gefährlich ist, da hohe Konzentrationen durch die Betäubung nicht wahrgenommen werden können. Nur bei relativ geringen H₂S-Konzentrationen kommt es zu einer geruchlichen Warnwirkung, es tritt rasch Gewöhnung ein. Schwefelwasserstoff besitzt die Eigenschaft, aufgrund seiner hohen Dichte schwerer als Luft zu sein und sammelt sich daher in tieferen Teilen von Räumen und Behältern an (Aktories 2005).

Für den Menschen ergeben sich konzentrationsabhängige Vergiftungserscheinungen. Physiologisch betrachtet, stellen das zentrale Nervensystem und der Atemtrakt die wichtigsten betroffenen Organe bei einer akuten

Schwefelwasserstoffvergiftung dar. Auf der einen Seite können sowohl Bewusstseinsverlust als auch zentrale Atemlähmung nach Inhalation hoher H_2S -Konzentrationen die Folge sein, die bereits nach wenigen Atemzügen eintreten können und sofort tödlich enden (= apoplektiforme Vergiftung). Auf der anderen Seite führen geringere H_2S -Konzentrationen zu Schwäche, Krämpfen, Hyperpnoe, Reizerscheinungen im Atemtrakt und möglicherweise auch zu Lungenödem. Aus diesen Symptomen ergeben sich Spätfolgen wie Pneumonie und Herzmuskeldegenerationen. Das Auftreten einer Corneaschädigung ist bei chronischem Kontakt zu beobachten (Aktories 2005).

1.1.4 Wirkungsmechanismus

Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht endgültig geklärt, aber es wird vermutet, dass Schwefelwasserstoff in hohen Konzentrationen Enzyme der oxidativen Phosphorylierung durch Sulfidbildung an den zentralen Metallatomen oder durch Disulfidbildung inhibiert. Symptome, die auf eine Vergiftung hinweisen, sind durch einen Mangel an Sauerstoff infolge von Zellstoffwechselstörungen zu erklären. Das bedeutet, dass die vordergründige Toxizität auf der Zerstörung des Hämoglobins beruht.

Betrachtet man die Pharmakokinetik von H_2S näher, so wird es im Organismus rasch zu Sulfat oxidiert und ausgeschieden. Direkte H_2S -Wirkungen sind demnach voll reversibel (Aktories 2005).

Die Therapie bei der akuten Vergiftung sollte symptomatisch erfolgen. Priorität hat hierbei die Erhaltung der Atmung.

1.1.5 Physiologische Bedeutung

Schwefelwasserstoff wird im menschlichen Körper in den Endothelzellen der Blutgefäße und in glatten Muskelzellen gebildet. Es fungiert ähnlich wie NO als Botenstoff mit gefäßerweiternder Wirkung.

Die Freisetzung von endogenem Dihydrogensulfid aus Endothelzellen erfolgt durch Stimulierung von Gefäßendothel über muskarinische Acetylcholinrezeptoren. Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin- γ -Lyase (CGL), zwei Enzyme die dabei die Aminosäure L-Cystein als Substrat verwenden, spielen eine wesentliche Rolle bei der Bildung von endogenem H_2S . Dies bewirkt die Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen in den glatten Muskelzellen der Gefäßmuskulatur. Es folgt eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen, was letztendlich zur Vasodilatation führt (Aktories 2005).

1.2. Muskelgewebe

Muskeln sind grundlegend für die aktive Fortbewegung eines Lebewesens und für viele innere Funktionen des Körpers sowie dessen Gestaltveränderung verantwortlich. Sie sind aus Muskelgewebe aufgebaut, das neben dem Epithelgewebe, dem Binde- und Stützgewebe und dem Nervengewebe zu den vier Grundgeweben des menschlichen Körpers zählt.

Der Wirbeltierkörper besteht aus drei unterschiedlichen Arten von Muskelgewebe. Dazu gehört die glatte Muskulatur, die Herzmuskulatur und die Skelettmuskulatur. Die beiden letzteren Muskelgewebe werden auch als quergestreifte Muskulatur bezeichnet.

Muskelgewebe besitzt die besondere Fähigkeit des Kontrahierens. Es besteht aus langen erregbaren Zellen bzw. Fasern, die eine große Anzahl von kontraktilen Eiweißfäden, den sogenannten Myofibrillen, enthalten. Eine Myofibrille setzt sich aus den Sarkomeren, dicken Proteinfasern bestehend aus parallel angeordneten Myosin- und Actinfilamenten, zusammen. Eine Muskelkontraktion wird durch einen Nervenimpuls ausgelöst. Dabei werden Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Reticulum ausgeschüttet. Diese diffundieren zwischen die Actin- und Myosinfilamente und lösen dadurch eine Wechselwirkung aus, wobei sich die Actin- und Myosinfilamente ineinander verschieben. Bei diesem mechanischen Vorgang kommt es zur Verkürzung des einzelnen Sarkomers und somit auch der Muskelfaser.

Es folgt die Kontraktion des Muskels. Sobald der Nerv aufhört, den Muskel mit Impulsen zu versorgen, relaxiert dieser wieder, d. h. er erschlafft (Campbell 2003).

1.2.1 Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur ist für die willkürlichen Bewegungen des Körpers verantwortlich. Die raschen Muskelkontraktionen sind willentlich beeinflussbar und werden vom zentralen Nervensystem gesteuert. Aufgrund seiner parallel angeordneten Myofibrillen, die den Zellen unter dem Mikroskop ein quergestreiftes Muster verleihen, wird sie auch zu den quergestreiften Muskeln gezählt.

Der Skelettmuskel besteht aus Muskelfasern, die sich aus Bündeln langer Zellen zusammensetzen. Jede Faser enthält zahlreiche parallel angeordnete, strangförmige Myofibrillen, die sich in eine lineare Abfolge von Sarkomeren, den kontraktile Grundeinheiten des Muskels, unterteilen. Die zahlreichen Myofibrillen setzen sich aus den kontraktile Proteinen Actin und Myosin zusammen. Wechselwirkungen zwischen dünnen Actinfilamenten und dicken Myosinfilamenten erzeugen während der Muskelkontraktion Kraft (Campbell 2003).

1.2.2 Glatte Muskulatur

Im Gegensatz zur Skelett- und Herzmuskulatur zeigt der glatte Muskel keine Querstreifung. Er besteht aus spindelförmigen Muskelzellen, die keiner bewussten Kontrolle unterliegen. Es handelt sich dabei um unwillkürliche Muskeln, die man in den Wänden des Verdauungstraktes, der Harnblase, der Arterien und anderer innerer Organe findet.

In der glatten Muskelzelle sind die Actin- und Myosinfilamente bündelförmig kreuz und quer verteilt. Eine regelmäßige Anordnung zu Myofibrillen ist nicht zu beobachten.

Der glatte Muskel ist zu einer wesentlich länger andauernden Kontraktion in der Lage als ein quergestreifter Muskel, aber er arbeitet eher langsamer. Dies wird vom vegetativen Nervensystem gesteuert. Die Hauptaufgabe besteht darin, die Weite der

Hohlorgane gegen die dehnenden Kräfte zu halten oder zu verändern (Campbell 2003).

1.2.3 Herzmuskulatur

Die Herzmuskulatur bildet die kontraktile Wand des Herzens. Diese besitzt wie der Skelettmuskel, bei Betrachtung im Mikroskop, eine Querstreifung und zählt deshalb auch als quergestreifter Muskel. Die Ähnlichkeit zum Skelettmuskel liegt in dessen kontraktile Eigenschaften. Der Hauptunterschied ist aber, dass sich beim Herzmuskel die Muskelfasern verzweigen und sich über Glanzstreifen untereinander verbinden, was dem Synchronisieren des Herzschlags dient. Aufgrund der elektrischen Koppelung von Herzmuskelzellen mit anderen Herzmuskelzellen, kann sich ein Aktionspotential über alle Zellen des Herzmuskels ausbreiten und somit zur Kontraktion des gesamten Herzens führen.

In Skelettmuskelzellen löst das Aktionspotential eines Neurons die Kontraktion aus, während die Muskelzellen des Herzens selbst Aktionspotentiale generieren können, ohne Beitrag aus dem Nervensystem. Die Membran der Herzmuskulatur besitzt Schrittmachereigenschaften, weshalb Herzmuskelzellen auch nach ihrer Isolierung in Zellkultur weiterschlagen können.

Der Umstand der spontanen rhythmischen Depolarisation der Membran wurde bei der praktischen Durchführung dieser Diplomarbeit bei den Versuchsreihen am rechten Vorhof genutzt (Campbell 2003).

2 Ziel der Diplomarbeit

Ziel der praktischen Arbeit war es, die im Departement für Medizinische/Pharmazeutische Chemie neu synthetisierte Substanz SWS95HCl an isolierten Organen von Meerschweinchen, auf ihre biologische Aktivität zu testen.

Bei den isolierten und anschließend präparierten Organen handelte es sich um den Vorhof und den Papillarmuskel, welche zur quergestreiften Muskulatur zählen. Als glattmuskuläre Organe wurden Arteria pulmonalis, Aorta und terminales Ileum verwendet. An der Aorta und an der Arteria pulmonalis wurde ermittelt, ob die Einwirkung von SWS95HCl zu einer Vasodilatation führt, während am Darm ausgetestet wurde, ob eine spasmolytische Wirkung eintritt. Die Versuche am Papillarmuskel wurden durchgeführt, um die Inotropie zu messen. Beim Vorhof wurde die Wirkung auf die Chronotropie untersucht.

Diese Versuche wurden anschließend mittels Konzentrations-Wirkungskurven graphisch dargestellt, um so den EC_{50} -Wert, d.h. jene Konzentration, bei der es zu einer 50-prozentigen Veränderung im Vergleich zum Kontrollwert kommt, wenn vorhanden, zu ermitteln. Mit Hilfe dieser Werte konnte schließlich eine Aussage über die Wirkstärke der Testsubstanz getroffen werden. Das Organ mit dem niedrigsten EC_{50} -Wert wurde durch Zugabe von Glibenclamid (Antagonist) noch weiter auf seinen genauen Wirkungsmechanismus untersucht.

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um Meerschweinchen aus Auszuchtstämmen der Gattung TRIK.

Unter Auszucht versteht man die Auswahl der Zuchtpartner nach möglichst kleinem Verwandtschaftsgrad zur Vermeidung des Verlustes von Allelen. Die Meerschweinchen werden ohne Zufuhr von Zuchttieren von außen, in geschlossenen Zuchtkolonien gehalten. Tiere aus Auszuchtstämmen werden häufig in der Substanztestung verwendet (Campbell 2003).

Für die benötigten Versuche an isolierten Organen wurden sowohl weibliche, als auch männliche Meerschweinchen herangezogen. Diese Tiere hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 400 g und waren erst wenige Wochen alt.

Die Versuche wurden mit Meerschweinchen durchgeführt, weil ihre Ionenkanäle den menschlichen Verhältnissen ähneln.

Die verwendeten Organe sind die Aorta, terminales Ileum, Arteria pulmonalis, Vorhof und Papillarmuskel.

Abbildung 3: Präparierbesteck



Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch einen kräftigen gezielten Genickschlag, wodurch es zu einem schnellen Todeseintritt kam. Anschließend wurde der Thorax des Meerschweinchens behutsam geöffnet und alle zur Austestung meiner Substanz benötigten Organe entnommen. Zuerst wurde das Herz, aus dem später der rechte Vorhof und die Papillarmuskeln herauspräpariert wurden, dann der Darm und zum Schluss die Aorta entnommen.

3.2 Isolierung und Präparation der Organe

Abbildung 4: Mikroskop und Präparierbesteck



Bei der Präparation dienten, wie in Abbildung 4 gut zu erkennen ist, ein Mikroskop, eine Petrischale, in der ein Kork ausgelegt war, Scheren, Federschere, Pinzetten, Präpariernadeln und eine Pasteurpipette als Hilfsmittel.

Um die Organe nach ihrer Entnahme am Leben zu erhalten, wurden sie in der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung, einer Nährstofflösung, die auch als Tyrode-Lösung bezeichnet wird, aufbewahrt und mit einem Oxymix, der sich aus einem Gemisch von 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid zusammensetzt, begast. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Gewebe ausreichend mit Sauerstoff versorgt wurden und der pH-Wert der Nährstofflösung zwischen 7,2 und 7,4 aufrechterhalten wurde (siehe auch Kapitel 3.3).

Das Herz, das so rasch wie möglich entnommen werden musste, sowie der Darm und die Aorta wurden in drei unterschiedliche Gefäße mit Nährstofflösung gegeben und begast. Unter dem Mikroskop erfolgte schließlich die Präparation des Vorhofes, der Pulmonalarterien und der Papillarmuskeln aus dem Herzen. Es musste immer darauf geachtet werden, dass sich die Präparate in ausreichend Nährstofflösung befanden und mit Oxymix begast wurden, um zu verhindern, dass die Funktion der Organe beeinträchtigt wird und somit Ergebnisse verfälscht werden.

3.2.1 Atrium cordis dextrum (rechter Vorhof)

Das Herz ist ein Muskel, der sich aus einer linken und einer rechten Hälfte zusammensetzt, die wiederum jeweils aus einer größeren Kammer (Ventrikel) und einem kleineren Vorhof (Atrium) bestehen. Das Blut zirkuliert im Körper in zwei Kreisläufen:

Die rechte Herzhälfte befördert das Blut durch den Lungenkreislauf, während das Blut von der linken Hälfte durch den Körperkreislauf gepumpt wird.

Das sauerstoffarme Blut wird über eine obere und eine untere Hohlvene, die in den rechten Vorhof münden, aus dem Körperkreislauf dem Herzen zugeführt und im rechten Vorhof gesammelt. Zwischen der rechten Kammer und dem rechten Vorhof liegt die Triskuspidalklappe, die verhindert, dass bei der Systole (Kammerkontraktion) das Blut in den Vorhof zurückströmt. Anschließend wird es von der rechten Herzkammer über die Lungenarterien (Arteria pulmonalis) in die Lunge gepumpt, wo es mit Sauerstoff angereichert wird. Das nun sauerstoffreiche Blut gelangt über die Lungenvenen in den linken Vorhof. Von hier aus fließt das Blut über die Mitralklappe in die linke Herzkammer. Mit großem Druck wird es dann in die Hauptschlagader (Aorta) und somit in den Körperkreislauf gepumpt. Auf diesem Wege wird die Versorgung aller Zellen im Körper mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen sichergestellt.

Die Herzfrequenz wird vom Sinusknoten, dem primären Erregungsbildungszentrum in der Wand des rechten Vorhofs, bestimmt. Er sorgt für elektrische Impulse, die dafür verantwortlich sind, dass der Herzmuskel Blut in die Gefäße pumpen kann. Dieser sogenannte „Schrittmacher“ ist für die Erzeugung von selbstständigen elektrischen Signalen zuständig. Diese verteilen sich über die Vorhöfe und regen die Zellen zur Kontraktion an. Ein weiteres Erregungsbildungszentrum, der AV-Knoten, befindet sich am Boden des rechten Vorhofs. Der Vorhof liegt zwischen Vorhof und Kammer und sorgt dafür, dass die elektrische Erregung vom Vorhof in die Hauptkammer gelangt. Dies führt schließlich zur Kontraktion der Herzmuskelzellen und das Herz pumpt. Nachdem sich die Erregung der Zellen zurückgebildet hat, kann der nächste Impuls folgen (Campbell 2003).

Der Vorhof stellt ein ideales Modell zur Erforschung des Einflusses der Testsubstanz auf die Herzfrequenz (Chronotropie) dar.

Bei der Isolierung und Präparation des empfindlichen Vorhofs war besonders auf eine durchgehende Aufbewahrung in einer mit Oxymix begasten Elektrolytlösung zu achten. Bei der Präparation des Vorhofs wurde das Herz mit Hilfe von zwei Präpariernadeln im Kork der Petrischale befestigt, um daraufhin den rechten Vorhof entlang des Sulcus Coronarius vom Ventrikel zu trennen. Dieser wurde schließlich wieder in der Präparierschale befestigt und unter dem Mikroskop an seiner Ober- und Unterseite mit jeweils einem Silberdrahthaken versehen. Der Haken wurde an der Oberseite mit einem roten Faden, an der Unterseite mit einem schwarzen Faden angeknüpft, um so deren Kennzeichnung zu gewährleisten, die später beim Einhängen in die Apparatur von Bedeutung ist.

3.2.2 Musculus papillaris (Papillarmuskel)

Die Papillarmuskeln befinden sich in der rechten und linken Herzkammer, wobei es rechts drei und links nur zwei gibt. Es handelt sich dabei um warzenförmige Vorstülpungen der Herzmuskulatur, die über Sehnenfäden mit den Segelklappen verbunden sind. Zu Beginn der Kammersystole findet die Kontraktion der Papillarmuskeln statt. Dieser Umstand bewirkt, dass auch die Sehnenfäden gespannt werden, was wiederum verhindert, dass es zum Umschlagen der Klappen in die Herzvorhöfe kommt (Campbell 2003). Der Papillarmuskel stellt also ein ideales Modell dar, um die Wirkung der Testsubstanz auf die Kontraktilität zu erforschen. Für diese Versuche waren die Papillarmuskeln des rechten Ventrikels zu bevorzugen, da diese kleiner waren. Ihr maximaler Durchmesser sollte nicht über 0,87 mm liegen. Um schließlich die Kontraktionsfähigkeit am isolierten Papillarmuskel zu testen, mussten diese zuvor präpariert werden. Hierbei galt es im ersten Schritt die Papillarmuskeln freizulegen, indem der rechte Ventrikel von der Arteria pulmonalis bis zur Spitze des Herzens entlang des Septums geöffnet wurde. Damit es zu einem späteren Zeitpunkt bei den Versuchen zu keinen verfälschten Ergebnissen kommen kann, war zu beachten, dass die Purkinje-Fasern, die ebenfalls eine Spontanaktivität aufweisen, bei der Präparation entfernt wurden. Im zweiten Schritt wurde, im Gegensatz zu Darm und Vorhof, jeweils nur ein Silberdrahthäkchen an die einzelnen Papillarmuskeln angebracht. Damit war ein Einhängen in die Apparatur gewährleistet. Die andere Seite des Organs wurde in die Apparatur eingeklemmt, da

die Muskeln selbst nicht elektrisch spontan aktiv sind. Es handelt sich um sehr kleine Organe. Daher sollten die Häkchen nach Möglichkeit auch etwas kleiner sein, als die für die anderen Organe. Der Haken wurde am Ansatz der Papillarmuskelsehne angebracht. Bevor der Muskel schließlich gänzlich herauspräpariert wurde, musste zuvor noch die Sehne durchgeschnitten werden. Die fertigen Präparate wurden in einem mit der Tyrode befüllten Becherglas bis zur Weiterverwendung begast und aufbewahrt.

3.2.3 Arteria pulmonalis (Lungenarterie)

Es gibt eine rechte und eine linke Arteria pulmonalis. Die Aufgabe des rechten Ventrikels ist es, sauerstoffarmes Blut über seine beiden Abzweigungen, den Lungenarterien, in die Lunge zu pumpen. Auf diese Weise beginnt bei Säugern der Lungenkreislauf. Die beiden Äste, die auch als Lungenstamm bezeichnet werden, führen jeweils zu einem der beiden Lungenflügel, wo sie sich noch weiter verzweigen. In den Kapillaren der Alveolen wird das Blut wieder mit Sauerstoff angereichert. In ihrem Bau entspricht die Lungenarterie dem Stamm der Aorta, jedoch sind die Häute der Arteria pulmonalis viel dünner (Campbell 2003).

Die Pulmonalarterie wurde nach dem Vorhof und dem Papillarmuskel vom Herzen heraus präpariert. Bevor diese in dünne ringförmige Stücke geschnitten wurde, musste noch überflüssiges Fett- und Muskelgewebe entfernt werden. Die fertigen Lungenarterien-Präparate wurden bis zum Einspannen in die Apparatur in einer wie üblich begasten Nährstofflösung aufbewahrt.

3.2.4 Terminales Ileum (Darm)

Unter dem terminalen Ileum versteht man den letzten Abschnitt des Dünndarms, bevor dieser in den Dickdarm übergeht. Das Ileum wird auch als Krummdarm bezeichnet und stellt einen der drei Teile des gesamten Dünndarms dar. Die anderen Abschnitte sind das Duodenum und das Jejunum. Die Länge des terminalen Ileums variiert innerhalb einer Art deutlich, aber es wurde im Durchschnitt ein 20 cm langes Stück heraus präpariert. Bei der Entnahme des terminalen Ileums musste vorsichtig

vorgegangen werden, um es nicht zu beschädigen. Eine zu starke Dehnung sollte daher vermieden werden. Anschließend wurde das entnommene Darmstück am oberen, jejunalen Ende mit einem roten Faden zugeknüpft, um später eine Unterscheidung zwischen oberem und unterem Ende zu erleichtern. Danach wurde es in ein Becherglas gegeben, das mit Tyrode befüllt war und mit Sauerstoffgemisch begast wurde. Bei der Präparation wurden ca. 0,5 cm große Stücke vom caecal gelegenen Ende des Ileums schräg abgeschnitten, um zu gewährleisten, dass die Wirkstofflösung später an der Innenseite des Darms durch das Lumen zirkulieren kann. Dieses kurze Darmstück wurde daraufhin mit zwei Präpariernadeln am Kork in der Präparierschale angebracht und in Folge an beiden Enden, möglichst weit außen, mit Hilfe von färbiger Nähseide sowie Silberdrahthaken durch Doppelknoten befestigt. Die Begasung des Präparates mit Sauerstoff war während der letzten Vorgänge nicht zwingend nötig, da der Darm etwas unempfindlicher als die anderen Organe ist. Um aber für alle Versuche mit dem terminalen Ileum die gleichen Ausgangsbedingungen zu schaffen, mussten die Darmstücke noch von möglicherweise vorhandenen Chymusresten befreit werden. Dafür wurde mit einer Pipette Luft durch die Innenseite des Darms gepumpt. Zusätzlich konnte auch gleichzeitig kontrolliert werden, ob das präparierte Stück auch tatsächlich für die Lösung der Testsubstanz durchlässig ist. Zum Schluss wurden die präparierten Darmstücke sofort eingespannt oder wie gewohnt bis zur weiteren Verwendung in einem mit Tyrode befüllten Gefäß aufbewahrt.

3.2.5 Aorta descendens (Aorta)

Dieses glattmuskuläre Organ stellt den absteigenden Teil der Hauptschlagader dar. Im Körperkreislauf gelangt das Blut vom linken Ventrikel zuerst in den aufsteigenden Teil der Aorta, der Aorta ascendens. Diese verläuft senkrecht nach oben und beschreibt einen Bogen über dem Herzen, bevor sie in den absteigenden Teil, der Aorta descendens, übergeht. Dieser Abschnitt gliedert sich in zwei Teile, erstens die Brustaorta und zweitens die Bauchaorta. Die größte Arterie des Körpers stellt somit die Versorgung vieler Bereiche mit sauerstoffreichem Blut sicher (Campbell 2003). Nach der Tötung des Versuchstieres, wurde die Aorta als letztes Organ entnommen. Das Zwerchfell und die Lunge wurden entfernt, damit ein Herauspräparieren möglich

wurde. Anschließend schnitt man vorsichtig entlang des Rückgrats, nicht zu nahe an der Aorta, um diese zu isolieren. Eine zu starke Dehnung des Organs sollte wieder vermieden werden, sodass es nicht beschädigt und somit für die Versuche unbrauchbar wurde. Bei der Präparation wurde das isolierte Aorta-Stück mit zwei Nadeln am Kork der Präparierschale, die mit Tyrode-Lösung befüllt und mit dem Sauerstoffgemisch begast wurde, festgesteckt. Anhaftendes Gewebe wurde mit einer Federschere beseitigt. Dabei war es ratsam, sehr behutsam vorzugehen, um die Aorta nicht zu verletzen. In Folge wurde diese in ca. 3 mm große, ringförmige Stücke geschnitten und bis zum Einspannen in die Apparatur in begaster Nährstofflösung aufbewahrt. Die Aorta kann, wie die Pulmonalarterien, selbst in die Versuchsapparatur eingespannt werden, daher war ein Anbringen von Silberdrahthäkchen nicht erforderlich.

3.3 Physiologische Nährstofflösung und Begasung

Eine Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Versuche an isolierten Organen stellt die physiologische Elektrolytlösung, die auch als Tyrode bezeichnet wird, dar. Sie gewährleistet das Überleben und die weitere Funktion der isolierten Organe. Weiters dient sie als Aufbewahrungsmedium für bereits präparierte Organe, für die Herstellung der KCl-Lösung, die zur Kontraktion der Aorta und Pulmonalarterie bzw. des Darmes benötigt wurde, sowie zur Befüllung und zum Spülen der Organbäder. Diese Nährstofflösung wird sowohl für die Dauer der Bearbeitung, als auch für die Dauer der Lagerung mit Sauerstoff versorgt, um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. Zusätzlich sollte sie eine Temperatur von 37 Grad Celsius aufweisen.

Für das Gelingen der Versuche war die richtige Bereitung der Tyrode ebenfalls sehr entscheidend. Aus diesem Grund wurde sie nach Vorschrift von Reiter am Morgen frisch hergestellt. Sie entspricht somit einer modifizierten Krebs- Henseleit-Lösung (Reiter 1967).

Tabelle 1: Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung für den rechten Vorhof, Aorta, Darm, Pulmonalarterien und Papillarmuskeln

Substanz	Molare Masse g/mol	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	mmol/l
NaCl	58,44	1000,25 g/ 5l	33,60	114,90
KCl	74,55	50,33g/5l	35,00	4,73
NaHCO ₃	84,01	125,00g/5l	83,70	24,90
MgSO ₄	120,37	147,02g/5l	3,20	1,18
KH ₂ PO ₄	136,09	62,00g/250ml	1,18	1,18
CaCl ₂	110,98	34,00g/250ml	1,18	3,20
Glucose	180,16	Reinsubstanz	1,98	10,00

Bei der Umrechnung auf 2 Liter ergeben sich folgende Werte:

Tabelle 2: Anleitung zur Herstellung für 2 Liter

Komponente	Menge ml
NaCl	67,2
KCl	70
NaHCO ₃	167,4
MgSO ₄	2,36
KH ₂ PO ₄	2,36
CaCl ₂	6,4
Glucose	3,96 g

Wie bereits erwähnt, wurde die physiologische Elektrolytlösung jeden Tag frisch bereit. Die Komponenten konnten aus bereitgestellten Stocklösungen entnommen werden. Dafür wurden die in der Tabelle angeführten Substanzen, zunächst alle bis auf CaCl₂, in einen 2-Liter-Messkolben eingebracht und mit destilliertem Wasser auf ca. $\frac{3}{4}$ der Füllmenge aufgefüllt. Anschließend folgte die Begasung mit Oxymix für 20

Minuten. Erst danach wurde CaCl_2 tropfenweise hinzugefügt. Dabei war besonders darauf zu achten, dass es nur sehr langsam hinzugegossen wurde, um ein Ausfällen von schwerlöslichen Calciumkristallen und in weiterer Folge eine Trübung der Lösung zu vermeiden. Falls es doch zu einer Trübung kam, musste die Lösung verworfen und eine neue hergestellt werden. Abschließend wurde der Kolben bis zur Markierung mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mehrere Male kurz umgeschwenkt, um eine optimale Durchmischung zu erreichen.

Dann konnte die fertiggestellte Lösung in die Organbäder gefüllt werden, wo diese während des gesamten Versuchverlaufs temperiert und mit Oxymin durchperlt wurde. Somit konnten die physiologischen Bedingungen hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Sauerstoff gewährleistet werden.

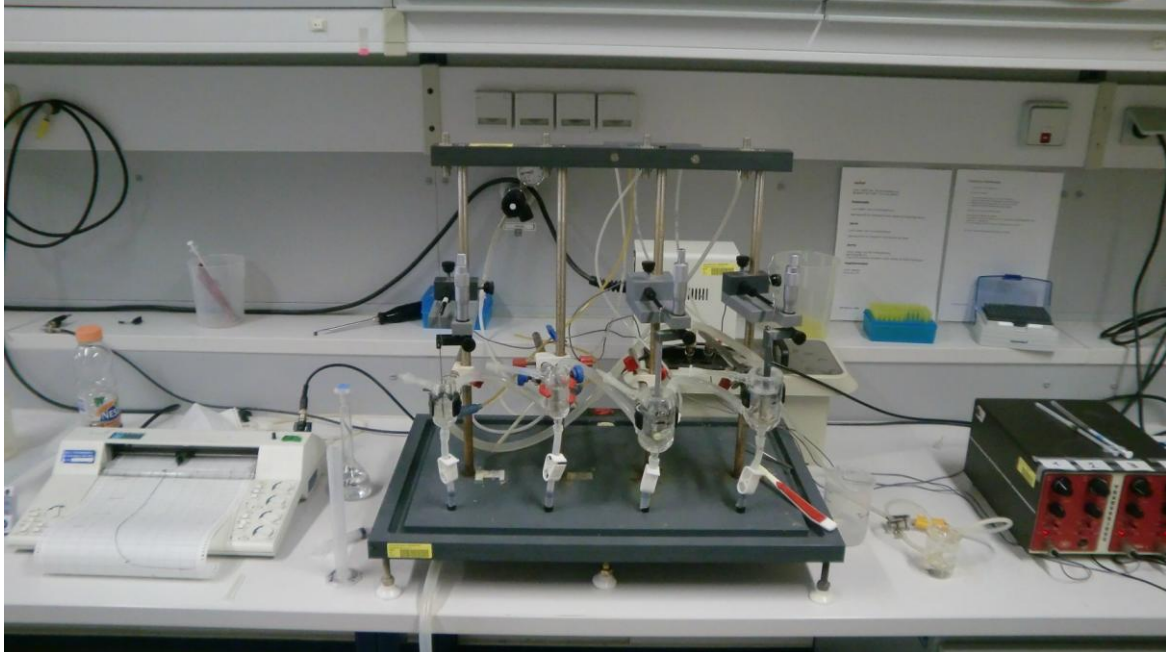
Bei der Herstellung der Tyrode ist eine genaue Einwaage der Substanzen, vor allem bei KCl, von großer Bedeutung, da die Elektrolytkonzentrationen im Körper ebenfalls in engen Bereichen liegen. Bereits geringe Konzentrationsüberschreitungen können weitreichende Folgen nach sich ziehen.

3.4 Versuchsapparaturen

Für die Versuche standen zwei unterschiedliche Apparaturen zur Verfügung. In der Versuchsapparatur 1 waren Versuche am rechten Vorhof, terminalen Ileum, Aorta und Arteria pulmonalis möglich, während in der Apparatur 2 die Untersuchung an den Papillarmuskeln erfolgte. Im Prinzip funktionieren beide Apparaturen gleich, ihr Unterschied liegt lediglich im Aufbau sowie im Befestigungsmechanismus. Bei beiden Apparaturen ist das Organ über einen Silberdraht mit dem Kraftwandler verbunden. Dieser wandelt, wie sein Name schon sagt, das mechanische Signal in ein elektrisches Signal um, das über einen Schreiber aufgezeichnet wird. Die mechanische Größe, die vom Kraftwandler erst in ein elektrisches Signal umgewandelt werden muss, um registriert zu werden, stellt die Kontraktionskraft dar. Dabei kommt es zu einer Veränderung an den Organen. Um das Signal für den Schreiber zu verstärken, war ein Verstärker oder Amplifier zwischengeschaltet. Die Aufgabe des Schreibers ist es, die Ergebnisse auf Millimeterpapier aufzuzeichnen. Zusätzlich verfügten beide Apparaturen über ein Wasser- und Organbad, sowie über eine Gaszufuhr.

3.4.1 Apparatur 1

Abbildung 6: Originalbild der Apparatur 1



Die Verwendung der Apparatur 1 war für die Untersuchung an allen isolierten und präparierten Organen, bis auf den Papillarmuskel, geeignet. Das Gefäß des Organbads war doppelwandig aufgebaut, sodass das Wasser mit einer Temperatur von 37 Grad Celsius direkt durchgeleitet werden konnte. Aus diesem Grund wurde diese Apparatur im Gegensatz zu Apparatur 2 nicht in das Wasserbad eingetaucht. Bevor das jeweilige Organ an der Organhalterung befestigt wurde, wurde das Gefäß mit destilliertem Wasser ausgespült, um mögliche Substanzreste vom vorherigen Versuch sicher zu entfernen. Anschließend wurde noch einmal mit der physiologischen Nährstofflösung gespült, bevor sie schließlich in das Gefäß eingefüllt wurde. Die Kammern der Gefäße hatten unterschiedliche Größe. Die Größere umfasste 25 ml, in dieser konnte man alle Versuchspräparate untersuchen, während in der kleineren 8ml umfassenden Kammer, nur Versuche mit der Arteria pulmonalis und der Aorta möglich waren.

Daher war die Menge der Tyrode, die in das Gefäß eingefüllt wurde, von dessen Größe abhängig. Entscheidend war beim rechten Vorhof genau 25 ml Tyrode einzufüllen, da dieses Versuchspräparat im Gegensatz zu den anderen

glattmuskulären Organen, später nicht noch zusätzlich mit 25 ml (oder 8 ml) KCl-Lösung versetzt wurde, um eine Kontraktion zu bewirken. Mit dieser chemischen Reizung mit KCl-Lösung wurde bei Aorta, terminalen Ileum und Arteria pulmonalis ausgetestet, ob die Testsubstanz eine relaxierende Wirkung auf die kontrahierten Organe zeigte. Hingegen wurde beim Vorhof die Auswirkung auf die Herzfrequenz untersucht.

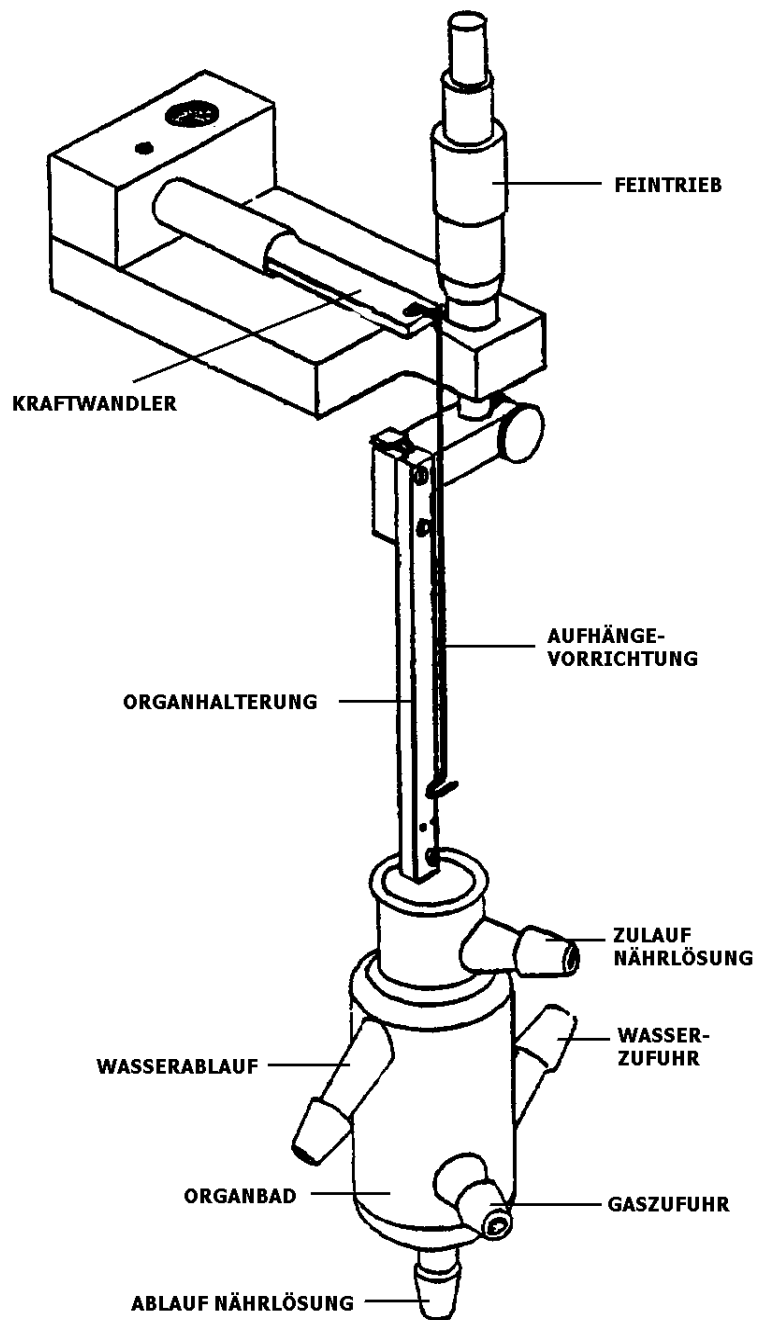
Die Aorta und Arteria pulmonalis konnten als ringförmige Präparate direkt auf der Hängevorrichtung zwischen beiden Silberdrähten eingehängt werden, während man bei Vorhof und Darm der angeknüpften Häkchen als Hilfsmittel bedurfte. Beim Einhängen musste darauf geachtet werden, dass die Versuchspräparate nicht zu stark gespannt waren, aber auch nicht zu locker durchhingen.

Um die Imitation von physiologischen Bedingungen zu erreichen, war direkt am Gefäß ein Schlauch angebracht, der das Sauerstoffgemisch transportierte und somit für die Bagasung der Tyrode-Lösung zuständig war.

Nach der Befestigung konnte das Organ in das temperierte, mit Oxymix begaste Organbad abgesenkt werden. Aufgrund der Plastizität der Organe wurde in Folge mittels Feintrieb eine Vorspannung angelegt. Die Einstellung der empirischen Werte wurde beibehalten, um immer die gleichen experimentellen Bedingungen aufrechtzuerhalten. Anschließend wurde mit KCl-Lösung eine Kontraktion erzwungen und deren Veränderung in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der Flachbrettschreiber diente der Aufzeichnung.

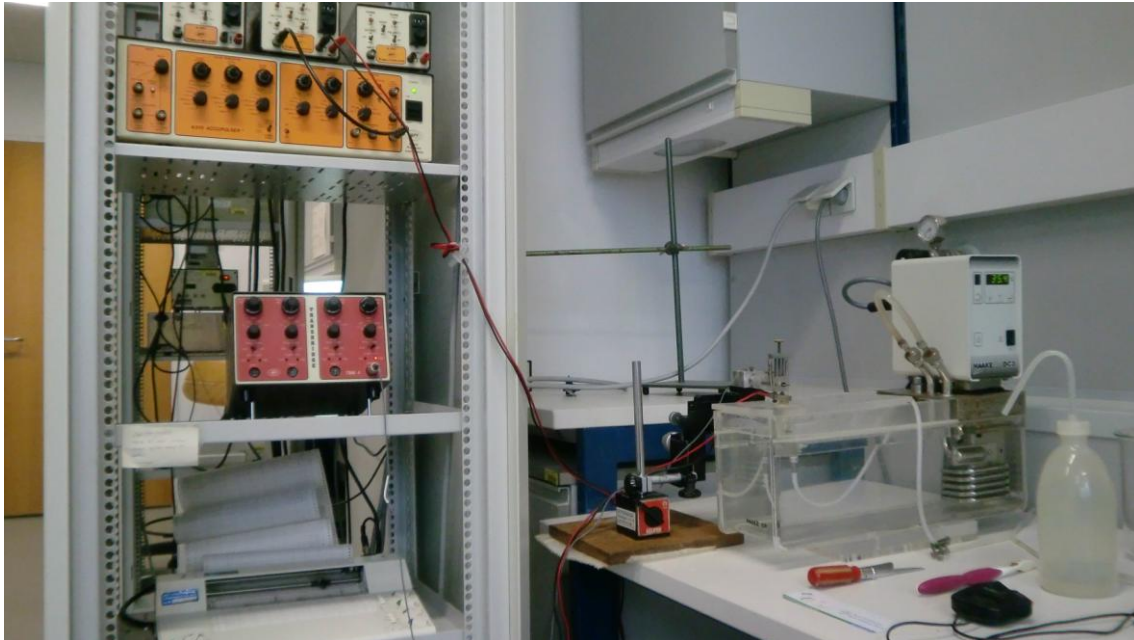
Zur besseren Veranschaulichung soll die nachfolgende Skizze dienen.

Abbildung 7: Skizze Apparatur 1



3.4.2 Apparatur 2

Abbildung 8: Originalbild der Apparatur 2

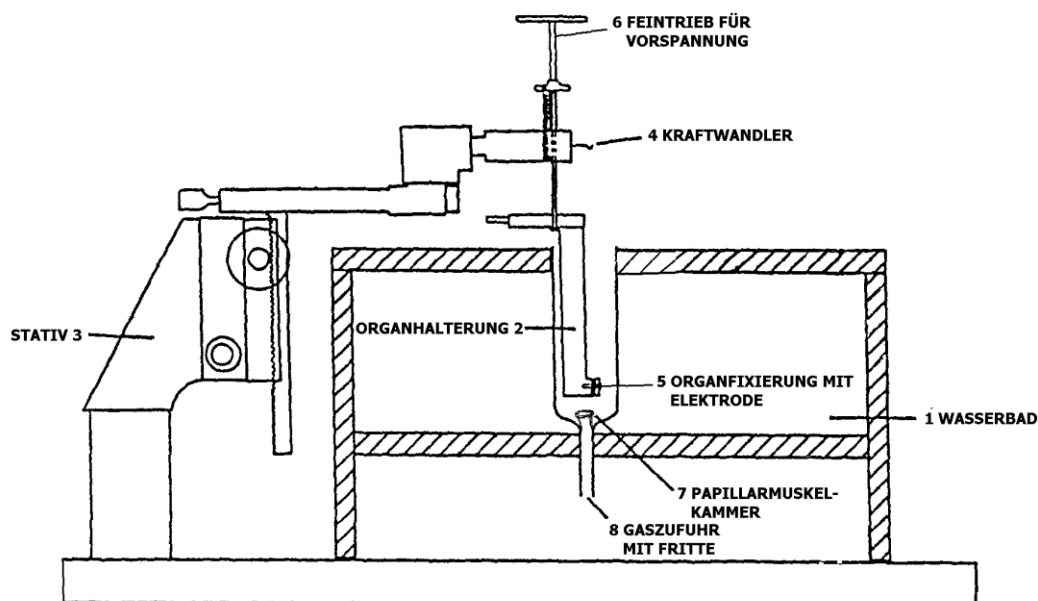


Wie bereits erwähnt, beschränkte sich die Verwendung dieser Apparatur ausschließlich auf Versuche mit dem Papillarmuskel. Dieses Gerät setzt sich aus einer Wasserbadwanne und einer hineinragenden Muskelkammer zusammen. Außerdem verfügt es über ein Stativ, an dem die Organfixierung mit Elektrode, der Kraftwandler und der Feintrieb für die Vorspannung befestigt sind (siehe Abbildung 9). Im Unterschied zur Apparatur 1 betrug das Wasserbad 35 Grad Celsius und die Kammer stellte auch gleichzeitig das Gefäß, das mit der Tyrode-Lösung befüllt wurde, dar. Bei dieser Apparatur gab es den Nachteil, dass die Kammer über keine Öffnung verfügte, über die man Tyrode oder destilliertes Wasser ablassen konnte. Hier diente eine Spritze zum Heraussaugen der Flüssigkeit als Hilfsmittel.

Das Gefäß wurde wieder je einmal mit destilliertem Wasser und daraufhin mit der Elektrolytlösung gespült, bevor ungefähr 10 Minuten vor Versuchsbeginn 25 ml Tyrode eingebracht wurden. In diesem Fall musste die Menge der Lösung genau bemessen sein. Die Zufuhr des Sauerstoffgemisches wurde von unten über eine Fritte geregelt. Sobald sich das Wasserbad auf die konstante Temperatur erwärmt hatte, konnte mit dem Einhängen des Papillarmuskels in die Apparatur begonnen

werden. Das Präparat wurde mit dem angebrachten Haken auf die Organaufhängevorrichtung, die mit dem Kraftwandler verbunden ist, gehängt und danach das freie Ende des Papillarmuskels zwischen einer Plexiglasscheibe und einer Elektrode eingeklemmt. Anschließend senkte man die Organhalterung in die Kammer ab, sodass das Organ komplett von der Nährlösung bedeckt wurde. Im Anschluss wurde über den Feintrieb die benötigte Vorspannung eingestellt. Da der Papillarmuskel nicht elektrisch spontan aktiv ist, musste er mit Rechteckimpulsen, ausgehend von einem Accupulser A 310- Stimulus Isolator A 360 (World Precision Instruments, Hamden, Florida, USA) über eine Platin-Kathode gereizt werden. Die entstehende Kontraktion wurde über den Silberchloriddraht auf den Kraftwandler übertragen und in Folge vom Schreiber dokumentiert.

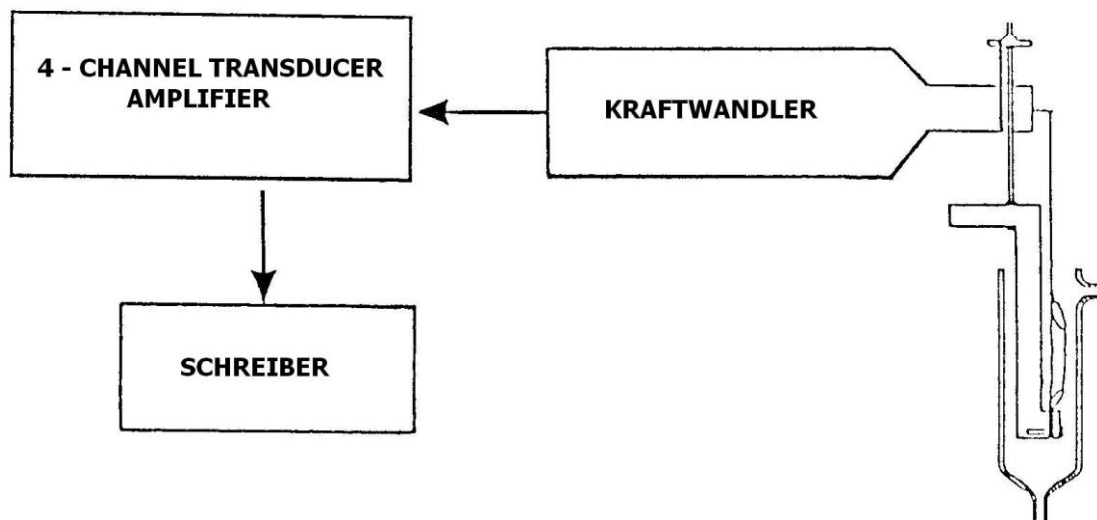
Abbildung 9: Apparatur 2



3.4.3 Der Kraftwandler

Der Kraftwandler stellt einen wesentlichen Bestandteil der Apparaturen dar. Das Prinzip beruht auf der Umwandlung eines mechanischen Vorganges in eine messbare, elektrische Größe. Dabei kommt es zu einer Änderung in der Dehnung, was wiederum zu einer Veränderung des Widerstandes im Dehnungsmessstreifen führt. Der nächste Schritt war die Beeinflussung der Stromstärke. In der Versuchsanordnung wurde ein Widerstandswandler (Typ AE875, Firma Aksjeselskapet, Horton, Norwegen) als Kraftwandler eingesetzt. Die Kontraktionsänderung wird als elektrisches Signal an einen Verstärker (Transbridge™ 4-Channel Transducer Amplifier; World Precision Instruments Sarasota, Florida, USA) weitergeleitet. Die Aufzeichnung der nun verstärkten Signale auf ein Millimeterpapier erfolgt über einen Schreiber (Flatbed Recorder BD-112 Dual Channel, Firma Kipp & Zonen, Niederlande).

Abbildung 10: Schematische Darstellung des Kraftwandlers



3.4.4 Die Gasversorgung

Wie bereits mehrmals in vorherigen Kapiteln erwähnt, ist eine ständige Versorgung der Organe mit Carbogengas essentiell, um die Gewebe der Organe am Leben zu erhalten. Die Sauerstoffversorgung mit dem Oxymix durfte während den Versuchsabläufen keinesfalls unterbrochen werden. Nur so konnten die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Werts und eine gleichmäßige Verteilung der Wirkstoffe in den Organbädern gewährleistet werden. Die Sauerstoffzufuhr wurde durch Schläuche erzielt, die mit den Organbädern verbunden waren. Die Gaszufuhr konnte über entsprechende Ventile grob geregelt werden. Eine zusätzliche Regelmöglichkeit für die Begasung mit Carbogen stellten Glasfritten dar, die sich direkt vor dem Einlass in die Bäder befanden. Damit wurde eine feine Zerstäubung der Luft ermöglicht.

Abbildung 11: Originalabbildung der Gaszufuhr



3.4.5 Das Wasserbad

Um optimale Versuchsbedingungen zu erhalten, mussten die Wasserbäder eine physiologische Temperatur aufweisen. Diese Temperaturkonstante wurde durch eingebaute Thermostate gewährleistet. Wie bereits im Kapitel besprochen, sollte für die Versuche an Aorta, Vorhof, Darm und Pulmonalarterie ein auf 37 ± 1 Grad Celsius temperiertes Wasserbad verwendet werden. Die Versuche am

Papillarmuskel wurden hingegen bei einer Wasserbadtemperatur von 35 ± 1 Grad Celsius durchgeführt.

Abbildung 12: Wasserbad

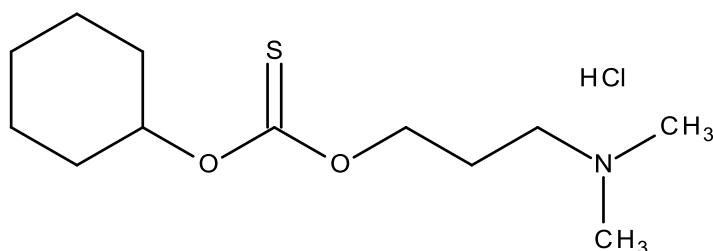


3.5. Versuchsablauf

3.5.1 Die Testsubstanz – SWS95HCl

Die zu prüfende Substanz SWS95HCl wurde an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien, am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie von der Arbeitsgruppe um Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Erker synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Abbildung 13: Struktur der Testsubstanz MG= 281



Nomenklatur der Testsubstanz: Cyclohexyl-[2-(Dimethylamino)propoxy]methanthioat-Hydrochlorid

Um der Versuchsanordnung zu entsprechen, musste die Substanz in Lösung gebracht werden. Die in Aqua bidestillata lösliche Testsubstanz wurde für jeden Versuch in 100 µl Lösungsmittel eingebracht, um eine Stammlösung herzustellen. Bei der Berechnung der Einwaage für die zu testende Substanz wurde deren Molekulargewicht und das Fassungsvermögen des entsprechenden Organbads einbezogen (siehe nachfolgende Abbildung). Nach vollständiger, kumulativer Zugabe der Substanzlösung in das Organbad, erreichte dieses am Ende eine Konzentration von 100 µmol/l.

Tabelle 3: Stammlösungen

Stammlösung	Molare Masse (g/mol)	Volumen Organbad (ml)	Einwaage (mg) für eine Endkonzentration von 100 µmol/l / Organbad
SWS95 HCl	281	8	0,22
SWS95 HCl	281	25	0,70

Die Stammlösungen wurden täglich frisch hergestellt. Bereits gelöste Testsubstanzen vom Vortag fanden keine Verwendung mehr und wurden folglich entsorgt.

Bevor man mit der Applikation der Stammlösung in das Organbad begonnen werden konnte, mussten die zu testenden Organe eine konstante Kontrollphase aufzeigen. Darm, Aorta und Pulmonalarterie mussten maximal kontrahiert sein, während die Herzfrequenz eine Regelmäßigkeit aufweisen und der Papillarmuskel konstant sein musste. In Abständen von 45 Minuten wurden 1, 2, 7, 20, und 70 µl der Stammlösung mit der Mikropipette eingespritzt. Um eine Störung des Versuches zu vermeiden, sollte dabei sehr gewissenhaft vorgegangen werden. Die Aufzeichnung könnte allein durch Berühren der Silberdrähte und des Kraftwandlers verfälscht werden. Die 45-minütigen Intervalle beruhen auf der Annahme, dass innerhalb dieser Zeit das steady-state-Gleichgewicht, also ein konstanter Blutspiegel, erreicht wird. Das Organ kann sich während dieser Zeit an das umgebende Milieu und an veränderte Gegebenheiten anpassen.

Tabelle 4: Darstellung des Pipettierschemas

Zugegebene Menge	Endkonzentration
100 µl	100 µmol/l
1 µl	1 µmol/l
2 µl	3 µmol/l
7 µl	10 µmol/l
20 µl	30 µmol/l
70 µl	100 µmol/l

3.5.2 Kaliumchlorid-Lösung zur Vorkontraktion

Alle glattmuskulären Organe wurden mit der Kaliumchlorid-Lösung chemisch gereizt und somit zur Kontraktion gebracht. Bei Papillarmuskel- und Vorhofpräparaten war keine Vorkontraktion erforderlich, da diese im Gegensatz zu Aorta, Darm und Pulmonalarterie, nicht auf eine vasodilatierende oder relaxierende Wirkung geprüft wurden. Durch die bewirkte Kontraktion konnte der Einfluss der Testsubstanz auf die Muskulatur des jeweiligen Organs beobachtet werden.

Täglich wurden zwei Kaliumchlorid-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen bereit. Für die Aorta und die Pulmonalarterie wurde eine 90 mmolare Lösung hergestellt, während der Darm mit einer 60 mmolaren KCl-Lösung kontrahiert wurde. Die Werte für diese Konzentrationen wurden experimentell ermittelt und führen im Versuch zu einer maximalen Kontraktion der glatten Muskulatur.

Zur Bereitung der Kaliumchlorid-Lösung für das terminale Ileum wurden 0,45 g Kaliumchlorid in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit frisch bereiteter Tyrode-Lösung bis zur Markierung aufgefüllt und gut geschüttelt. Für die Herstellung der Lösung zur Vorkontraktion von Aorta und Arteria pulmonalis wurden 0,67 g KCl in 100 ml physiologischer Nährstofflösung benötigt.

3.5.3 Versuchsablauf am rechten Vorhof

Nach der Isolierung und Präparation, die im Kapitel 3.2.1 bereits erläutert wurde, wurde der rechte Vorhof vorsichtig zwischen den Silberdrähten der Apparatur eingehängt. Hierbei war es wichtig, jenes Häkchen, das mit dem roten Faden angeknüpft wurde, auf den oberen Draht zu platzieren. Auf diese Weise wurde die Lage des rechten Vorhofs im Körper des Meerschweinchens nachgeahmt. Da das empfindliche Organ während der Zeit des Einspannens nicht mit der Tyrode-Lösung in Berührung kam, musste darauf geachtet werden es rasch zu befestigen. Andernfalls würde das Gewebe des Versuchspräparates nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt, und ein Absterben wäre die Folge. Außerdem musste eine Beschädigung des Muskels durch zu starke Dehnung vermieden werden. Anschließend wurde der Vorhof in das mit 25 ml Nährstofflösung befüllte Organbad, das bereits mit Oxygym durchperlt wurde, abgesenkt. Die Versorgung mit Carbogen wurde so gewählt, dass es nicht zu stark, aber auch nicht zu schwach in das Gefäß sprudelte. Bei verminderter Sauerstoffzufuhr besteht die Gefahr, dass das Organ während des Versuches unterversorgt wird und abstirbt. Bei vermehrtem Einströmen bewegt sich der Silberdraht unkontrolliert, sodass dies zu einer verfälschten Aufzeichnung am Millimeterpapier führen könnte. Nun konnten alle weiteren erforderlichen Einstellungen vorgenommen werden, die für den korrekten Versuchsablauf unerlässlich waren. Im ersten Schritt wurde der Schreiber eingeschaltet und der Stift mit Hilfe eines Drehrades auf die Nulllinie justiert. Der Flachbrettschreiber musste auf die Stromstärke 5 mV und auf Speed 5 mm/Sekunde eingestellt werden. Im nächsten Schritt wurde der Amplifier aktiviert, was meistens dazu führte, dass sich der Stift des Schreibers wieder von der Nulllinie entfernte. Diesen Umstand musste man korrigieren, bevor die Vorspannung von 10,4 mN mit Hilfe des Feintriebes vorgenommen wurde. Da das Organ eine natürliche Plastizität aufweist, wurde die Vorspannung eingestellt, um immer gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Es folgte eine mindestens 30-minütige Wartezeit, in der der Vorhof eine Gewöhnungsphase durchlief. Danach konnte mit den Kontrollmessungen begonnen werden. Dazu wurde der Schreiber alle 5 Minuten abgesenkt, um die Schlagfrequenz über einen Zeitraum von 12 Sekunden aufzuzeichnen. Bei einer Geschwindigkeit von 5 mm/Sekunde entsprach dies einer Schreib-Strecke von 6 cm, wobei 1 cm auf dem Millimeterpapier, ein Kästchen

darstellte. Die Messungen wurden solange durchgeführt, bis sich die Herzfrequenz normalisiert hatte und über mindestens vier Messungen konstant blieb. Erst danach konnte mit der Substanzzugabe nach dem bereits erwähnten fixen Pipettierschema begonnen werden. Nachdem die erste Konzentration zugegeben wurde, folgte alle 5 Minuten eine Kontrolle der Frequenz. Nach 45 Minuten wurde die nächste Konzentration in das Organbad eingespritzt usw.

Die Berechnung der Herzfrequenz ergibt sich aus der Anzahl der Schläge innerhalb von sechs Kästchen, multipliziert mit fünf.

3.5.4 Versuchsablauf am Papillarmuskel

Der präparierte Papillarmuskel wurde, wie im Kapitel 3.4.2 beschrieben, in die Apparatur 2 eingeklemmt und in das mit Nährstofflösung befüllte und begaste Organbad eingebracht. Im Anschluss wurde der Schreiber aktiviert, der Stift auf die Nulllinie gefahren und der Verstärker eingeschaltet. Nach einer kurzen Gewöhnungsphase wurde eine Spannung von 3,92 mN vollzogen. Um die Vorspannung während des Versuches konstant zu halten, wurde mit dem Feintrieb stets nachjustiert. Somit konnte eine Abnahme der Kontraktionskraft durch eine verringerte Ausgangsspannung verhindert werden (Reiter M).

Da der Papillarmuskel im Gegensatz zum Vorhof keine elektrische Spontanaktivität aufweist, musste dieser mit Hilfe eines Reizgerätes (A310 Accupulser, Firma WPI) in Form von Rechteckimpulsen gereizt werden. Diese Impulse wurden 60 mal pro Minute, also bei einer Frequenz von 1 Hertz, ausgesendet. Der Muskel wurde durch die Reize über Silberelektroden stimuliert und in Folge kontrahiert. Beobachtete man, dass der Papillarmuskel selbstständig, also vor Setzung von Reizen, kontrahiert, ließ sich daraus schließen, dass Purkinje-Fasern bei der Präparation nicht vollständig entfernt wurden. Die angewendete Stromstärke, die über eine Isolation-Unit geregelt wurde, sollte ca. 10 % über der minimalen Reizschwelle liegen. Eine hoch gewählte Stromstärke bewirkt die Entleerung der Katecholaminspeicher, was letztlich zu verfälschten Ergebnissen oder dem Absterben des Präparates führt. Dabei würde die Amplitude des kontrahierenden Papillarmuskels von selbst abnehmen. Dieses Ereignis wird auch als sogenannter „run down“ bezeichnet. Der gegenteilige Fall, eine zu niedrige Stromstärke, führt zu nicht messbaren Kontraktionen. Die Versuche

starteten mit einer Stromstärke von 2 mV. War die Muskelkontraktion bei dieser Voltzahl zu schwach, konnte sie auf 5 mV erhöht werden. Die Stromstärke musste bei der Berechnung der Kontraktionskraft miteinbezogen werden.

Nachdem sich der Papillarmuskel für etwa eine halbe Stunde an das ihn umgebende Milieu angepasst hatte, konnte mit den Kontrollmessungen fortgefahren werden. Dazu wurden mit dem Schreiber im Abstand von 5 Minuten sechs Amplituden der Kontraktionen aufgezeichnet, solange, bis diese drei mal in Folge konstant war. Die Längen der Amplituden wurden mit einem Lineal vermessen.

Anschließend konnte mit der kumulativen Substanzzugabe nach dem gewohnten Pipettierschema begonnen werden. Am Ende jedes Konzentrationsintervalls erfolgte eine Aufzeichnung bei 20 mm/Sekunde, wodurch eine besser vermessbare Amplitude erreicht wurde.

3.5.5 Versuchsablauf an der Aorta

Die Aorta wurde bei der Präparation in ringförmige Stücke geschnitten. Dadurch konnten diese vorsichtig, ohne die Anbringung von Häkchen, zwischen zwei Drähten der Aufhängevorrichtung in der Apparatur 1 eingefädelt werden. Danach wurden zügig alle weiteren Vorbereitungen getroffen. Im ersten Schritt wurde das Präparat in das Organbad abgelassen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zuschaltung des Schreibers und des Amplifiers sowie die Durchführung der Nullpunkteinstellung, wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben wurde. Anschließend wurde mit Hilfe des Feintriebs bei 10 mV auf 10 cm vorgespannt, was umgerechnet 19,6 mN ergab. Nach einer Entspannungsphase von 20 Minuten wurde auf 5 mV, folglich 9,81 mN, umgestellt. Dadurch kam es wieder zu einer Verschiebung des Schreibstiftes vom Nullpunkt, was korrigiert werden musste. Danach konnte der Schreiber abgesenkt und die Nährstofflösung über einen Ablaufschlauch aus dem Gefäß abgelassen werden, nachdem mit einem Meßzylinder die genaue Menge von 25 ml bzw. 9 ml einer 90 mmolaren Kaliumchlorid-Lösung abgemessen wurde. Dieses neue Medium für die Aorta wurde in Folge direkt in das Organbad geleert, um eine sofortige schnelle Kontraktion der Aorta zu bewirken. Diese setzte sich langsam fort, bis im idealen Fall eine Plateauphase erreicht wurde. Nach mindestens 45 Minuten wurde diese in den meisten Fällen erzielt d. h. die Kontraktion war konstant und es konnte

mit der kumulativen Substanzzugabe im Abstand von 45 Minuten nach bekanntem Schema begonnen werden. Die Plateauphase der aufgezeichneten Kurve entsprach der maximalen Kontraktionskraft und diente somit als Referenz für die vasodilatierende Wirkung der Testsubstanz.

3.5.6 Versuchsablauf an der Pulmonalarterie

Beim Versuch an der Arteria pulmonalis verliefen alle Schritte bis hin zur Dokumentation analog zum Versuchsablauf an der Aorta. Der einzige Unterschied bestand darin, dass eine Vorspannung von 9,81 mN bei 5 mV angelegt wurde und diese während des gesamten Versuches konstant belassen wurde.

3.5.7 Versuchsablauf am terminalen Ileum

Der präparierte Darm wurde mit dem caecal gelegenen Teil nach unten in die Organhalterung eingespannt (siehe Kapitel 3.2.4). Um die Beschädigung des Versuchspräparates zu verhindern, wurde dabei wieder sehr behutsam vorgegangen. Im Folgenden wurde das Präparat in das Organbad abgesenkt und alle Geräte aktiviert. Die Vorspannung war hier mit 4,92 mN bei einer Stromstärke von 5 mV anzulegen. Es folgte eine 20-minütige Anpassungsphase, in der sich die Darmmuskulatur an die Bedingungen gewöhnen konnte. Da es dabei zu Veränderungen der Darmperistaltik kam, war es nicht verwunderlich, dass sich der Schreibstift von der Nulllinie entfernte. Dieser Umstand musste wieder korrigiert werden.

Nun wurde analog zur Aorta vorgegangen. Zuerst wurde Tyrode abgelassen, daraufhin die Kaliumchlorid-Lösung zugesetzt. Im Unterschied zum Versuch an Aorta und Pulmonalarterie, handelte es sich hier um eine 60 mmol konzentrierte KCl-Lösung. Diese bewirkte beim Darm eine schnelle und starke Kontraktion, die man am Millimeterpapier gut beobachten konnte, gefolgt von einer wieder ebenso raschen Abnahme, bis sie sich schließlich bei der Hälfte der ursprünglichen Konzentration einpendelte. Nach in etwa 45 Minuten erreichte die Kontraktion des Darms eine Konstanz, bei der mit dem Zugeben der Testsubstanz begonnen werden konnte.

Falls aber keine eindeutige Plateauphase erreicht wurde und die Kontraktion proportional mit der Wartezeit abnahm, musste das Präparat verworfen und mit einem neuen Versuch gestartet werden.

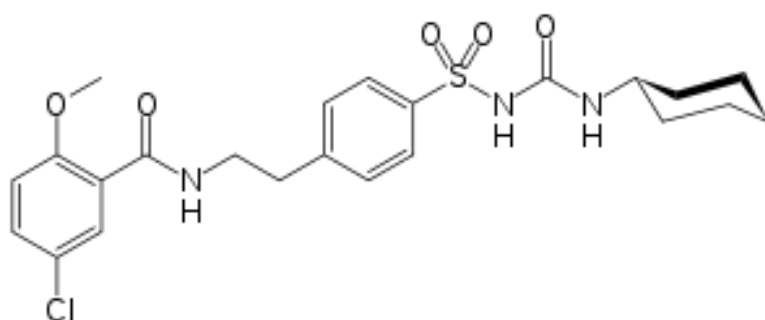
3.5.8 Versuchsablauf am terminalen Ileum unter dem Einfluss von Glibenclamid

Der Versuchsablauf wurde bis zur Plateauphase der Kontraktion analog zu den vorangegangenen Versuchen am terminalen Ileum durchgeführt.

Nachdem die Kontraktion der Darmmuskulatur konstant war, konnte die Aufzeichnung des Wirkmechanismus weitergeführt werden, indem der Antagonist Glibenclamid in zwei unterschiedlichen Konzentrationen und in jeweils getrennten Versuchsreihen, zugesetzt wurde. Zum einen wurde mit 30 $\mu\text{mol/l}$ gearbeitet, zum anderen mit 100 $\mu\text{mol/l}$. Nach einer Wartezeit von 45 Minuten wurde die Testsubstanz in einer Konzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ eingebracht. Die Menge an SWS95HCl entspricht der Konzentration des EC_{50} -Wertes. Das Ende des Versuches war nach einer wiederholten Wartezeit von 45 Minuten erreicht.

3.5.9 Glibenclamid – Verwendete Substanz zur Untersuchung des Wirkmechanismus

Abbildung 14: Strukturformel



MG = 494,0 g/mol

Glibenclamid wird aufgrund seiner blutzuckersenkenden Wirkung therapeutisch als orales Antidiabetikum eingesetzt und gehört zur Gruppe der Sulfonylharnstoffderivate. Die Substanz wirkt als Hemmer von ATP-abhängigen Kaliumkanälen, und ist deshalb für diese Diplomarbeit bei der Erforschung des Wirkmechanismus von SWS95HCl von Interesse. Es sind viele verschiedene K_{ATP} -Kanäle bekannt, welche sich in ihrem molekularbiologischen Aufbau unterscheiden. Ein Kaliumkanal besteht sowohl aus einer porenbildenden Untereinheit als auch aus einem Regulatorprotein, dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR). Es gibt drei SUR: In den pankreatischen B-Zellen finden sich Rezeptoren der Struktur SUR1, während Herz- und Skelettmuskel K_{ATP} -Kanäle vom Subtyp SUR2_A enthalten. In der glatten Muskulatur sind SUR2_B-K-Kanäle bekannt. Der SUR1 zeigt eine hohe Affinität zu Glibenclamid. Die anderen Kanäle lassen sich zwar von Glibenclamid blockieren, sind aber wesentlich unempfindlicher. Glibenclamid bindet in der B-Zelle des Pankreas an SUR1 und bewirkt somit die Schließung von ATP-abhängigen Kalium-Kanälen. Daraus resultiert eine Membrandepolarisation, die in Folge zur Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen führt. Dadurch strömt Calcium in die Zelle und startet die Insulinsekretion. Die Wirksamkeit von Glibenclamid ist an eine Insulinsekretion gebunden, daher kann die Substanz nur bei Typ2-Diabetikern verabreicht werden, bei denen die körpereigene Insulinproduktion wenigstens noch teilweise erhalten ist. Ein Nachteil der Sulfonylharnstoffderivate ist die blutzuckerunabhängige Steigerung der Insulinsekretion, wodurch es leicht zu schweren Hypoglykämien kommen kann. Um eine Sulfonylharnstoffhypoglykämie zu beheben, ist die fortlaufende Infundierung von Glucose erforderlich. Bei Typ2-Diabetes Patienten, die ihre Diät streng einhalten und regelmäßige Mahlzeiten zu sich nehmen, ist das Risiko eines hypoglykämischen Zwischenfalls reduziert (Aktories 2005).

3.6 Auswertung der Versuchsreihen und Statistik

3.6.1 Atrium dexter

Die vorgenommenen Messungen am rechten Vorhof wurden durchgeführt, um die Wirkung von SWS95HCl auf die Schlagfrequenz des Sinusknoten, also auf die Chronotropie, zu testen. Wie bereits im Kapitel 3.5.3 beschrieben, wurden die Schläge für 12 Sekunden alle 5 Minuten aufgezeichnet. Bevor die Testsubstanz in der ersten Konzentration in das Organbad zugegeben wurde, zählte man die Anzahl der Schläge innerhalb von 6 Kästchen auf dem Millimeterpapier. Zu diesem Zeitpunkt war die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs konstant, daher stellte diese Kontrollmessung den Vergleichswert mit 100% dar. Dieser Wert wurde mit den übrigen Messungen bei den darauf folgenden Konzentrationen verglichen und es wurde der Prozentsatz ermittelt. Um die Frequenz pro Minute zu erhalten, wurden die Ausschläge noch zuvor mit 5 multipliziert. Somit konnte man eine Aussage darüber treffen, ob SWS95 eine neutrale, positive oder negative chronotrope Wirkung zeigt. Wenn der Prozentsatz unter 100 liegt, wirkt die Testsubstanz negativ chronotrop während ein über 100 liegender Prozentsatz auf eine positive Chronotropie hinweist.

3.6.2 Musculus papillaris

Am Papillarmuskelpräparat wurde getestet, ob die Testsubstanz eine Änderung auf die Kontraktionskraft bewirkt. Bei den Messungen wurden die Amplituden nicht permanent dokumentiert, sondern wieder nur alle 5 Minuten. Es wurden jeweils sechs Amplituden aufgezeichnet und anschließend mit dem Lineal vermessen. Um die einzelnen Ergebnisse in mN zu erhalten, mussten die zuvor ermittelten Werte in der Maßeinheit cm, mit dem Eichfaktor des Kraftwandlers, der 0,98 beträgt, multipliziert werden. Außerdem musste bei der weiteren Auswertung berücksichtigt werden, dass die Amplituden bei unterschiedlichen Stromstärken, 2 mV oder 5 mV, vermessen wurden. Daher wurden die erhaltenen Messwerte bei 2 mV zusätzlich mit 0,4 multipliziert und damit standardisiert. Der konstante Wert vor der ersten Substanzzugabe stellte den Vergleichswert dar und wurde als 100% betrachtet. Die

darauf folgenden Messungen, jeweils nach Ablauf der 45 Minuten, wurden mit der Kontrollmessung verglichen und es konnte in Folge eine prozentuelle Zu- oder Abnahme der Inotropie berechnet werden.

3.6.3 Aorta descendens, Arteria pulmonalis und terminales Ileum

In den Versuchen mit den glattemuskulären Organen wurde die dilatierende bzw. spasmolytische Wirkung der Testsubstanz ermittelt, nachdem diese durch Zugabe der Kaliumchlorid-Lösung maximal kontrahiert wurden. Der Schreiber dokumentierte eine Kurve, die die Wirkung der Substanz auf die jeweiligen Präparate veranschaulichte. Der exakte Zeitpunkt für die Substanzzugabe in den jeweiligen Konzentrationen erfolgte in 45-Minuten-Abständen und wurde am Millimeterpapier mit einem Strich gekennzeichnet, um später die Auswertung zu erleichtern. Um eine mögliche Veränderung von Konzentration zu Konzentration berechnen zu können, wurde der Wert vom Nullpunkt bis zur Plateauphase als Referenz angenommen und somit als 100 % angesehen. Danach wurden die weiteren Abstände, ausgehend von der Nulllinie bis zur jeweiligen gekennzeichneten Markierung, gemessen, mit dem Referenzwert verglichen und der Prozentsatz ermittelt. Da 1 cm am Millimeterpapier 0,98 mN entspricht, wurden die Messwerte noch mit dem Eichfaktor 0,98 multipliziert. So konnten die Werte untereinander verglichen und eine Aussage über die Wirkstärke der Testsubstanz getroffen werden.

3.7 Statistik

Um die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen statistisch auswerten zu können, wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) gebildet. Aus diesen Werten wurden Konzentrations-Wirkungskurven graphisch dargestellt, wobei auf der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in % und auf der x-Achse die Konzentrationen der Testsubstanz in $\mu\text{mol/l}$ logarithmisch veranschaulicht wurde. Für die Berechnung der EC_{50} -Werte wurde das Programm Sigma Plot verwendet. Es erstellte eine graphische Darstellung, aus der man jenen Wert ablesen konnte, der die mittlere effektive Konzentration der Testsubstanz in mmol/l , bei der es zu einer Veränderung der Kontraktionskraft bzw. Schlagfrequenz auf die Hälfte des Kontrollwertes kommt, darstellt. Um die Irrtumswahrscheinlichkeit der Messwerte signifikant beurteilen zu können, wurde in weiterer Folge der Student-t-Test durchgeführt, der besagt, dass Werte von $< 5\%$ ($P < 0,05$) und $< 1\%$ ($P < 0,01$) als signifikant eingestuft werden, während Werte $< 0,1\%$ ($P < 0,001$) als hochsignifikant gelten.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Testsubstanz SWS95HCl

4.1.1 Wirkung von SWS95HCl auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileums

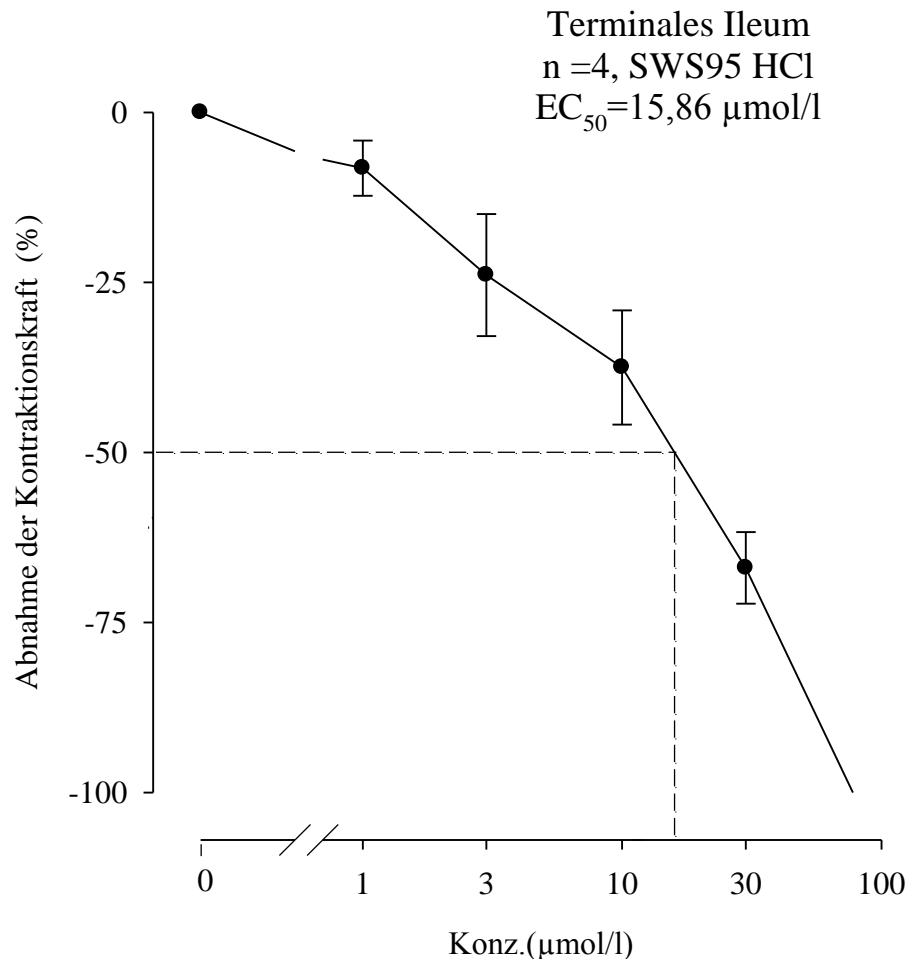
In vier Versuchen galt es zu ermitteln, ob die Testsubstanz eine spasmolytische Wirkung auf das terminale Ileum aufweist. Der Kontrollwert wurde durch Errechnung des arithmetischen Mittelwertes der Versuchsgesamtheit festgestellt. Dieser betrug in diesem Fall $9,65 \pm 0,85$ mN. Nachdem die erste Konzentrationsstufe durchlaufen war, konnte man bereits feststellen, dass SWS95HCl eine Wirkung auf das terminale Ileum besitzt. Erst bei der Badkonzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ war eine signifikantere dilatierende Wirkung zu erkennen, welche sich mit zunehmender Konzentration verstärkte. Der EC_{50} -Wert von SWS95HCl liegt bei einer Konzentration von $15,86 \mu\text{mol/l}$, was eine Abnahme der Kontraktion um die Hälfte bewirkte. Dieser ermittelte EC_{50} -Wert identifiziert SWS95HCl als potentiell stark wirksame Substanz.

Tabelle 5: Versuchsergebnisse von SWS95HCl am Darm

SWS95HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$9,65 \pm 0,85$	0 ± 0	4	----
1	$9,09 \pm 1,19$	$-6,90 \pm 4,07$	4	n.s.
3	$7,55 \pm 1,51$	$-24,04 \pm 8,99$	4	0,05
10	$5,90 \pm 1,28$	$-40,72 \pm 8,41$	4	0,01
30	$3,36 \pm 0,78$	$-66,52 \pm 5,27$	4	0,001
100	0 ± 0	-100 ± 0	4	0,001

In Tabelle 5 sind die Mittelwerte der Kontraktionsänderung (f_c) samt Standardfehler (SEM) und ihre Entsprechung in % angeführt. n steht für die Anzahl der Versuche, während P die Irrtumswahrscheinlichkeit angibt.

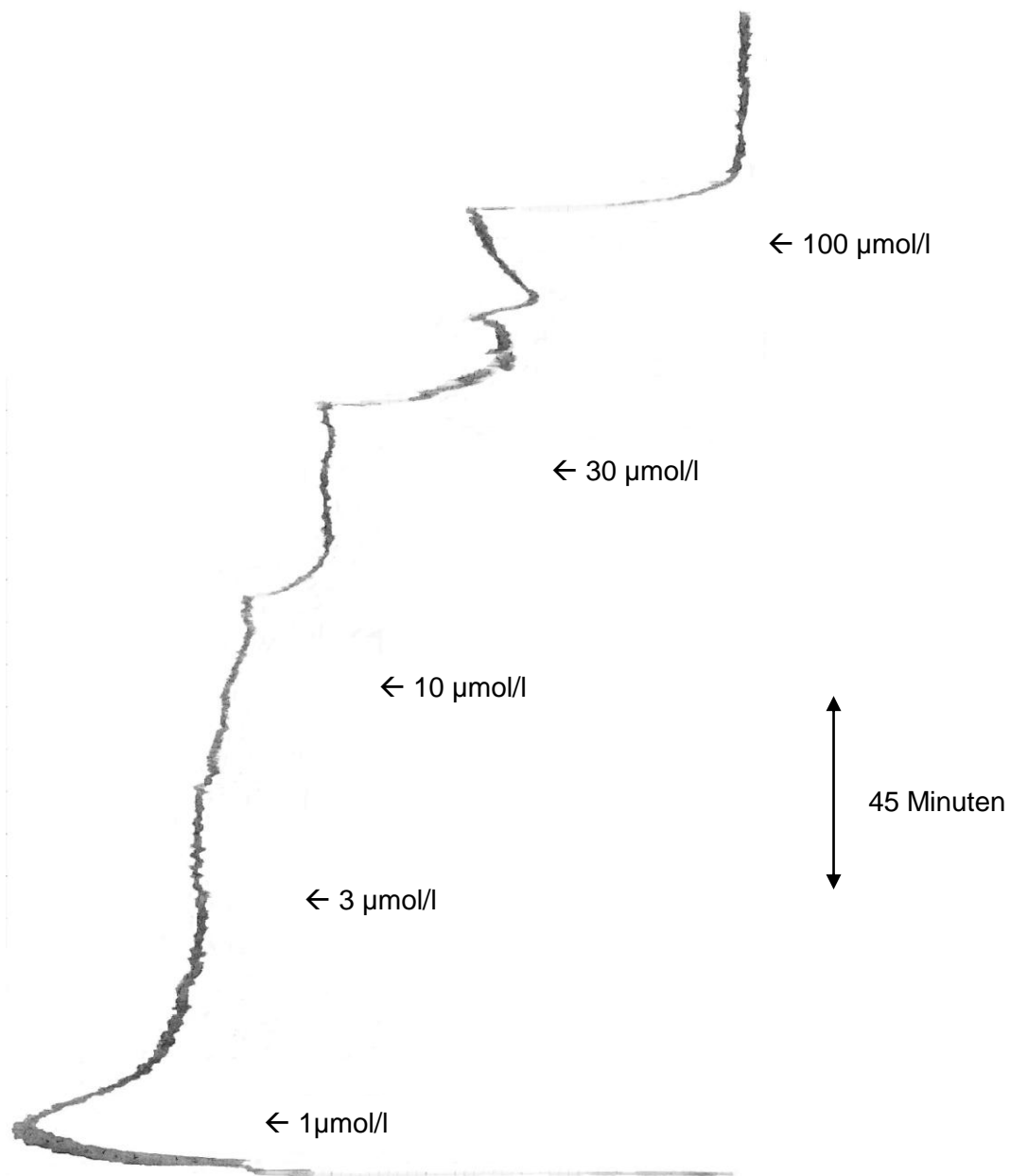
Diagramm 1: Konzentrations- Wirkungskurve von SWS95HCl am terminalen Ileum



In dieser Graphik ist die effektive Wirkung von SWS95HCl ersichtlich. Die Kurve fällt bereits bei einer Badkonzentration von $3 \mu\text{mol/l}$ steil ab, und erreicht noch vor $100 \mu\text{mol/l}$ die maximal mögliche Dilatation.

Auf der Abszisse wurde die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ eingetragen, während auf der Ordinate die Abnahme der Kontraktionskraft in % dargestellt wurde. Die Punkte dienen der Markierung der Mittelwerte der verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz. Die Punkte durchquerenden Balken symbolisieren den Standardfehler.

Abbildung 15: Originalaufzeichnung der spasmolytischen Wirkung von SWS95HCl auf den Darm



Die vom Schreiber dokumentierte Aufzeichnung entspricht der bereits erwähnten Abnahme der Kontraktionskraft des Darms durch SWS95HCl. Durch den raschen Abfall der Kurve, jeweils nach erneuter Substanzzugabe, lässt sich die Abnahme der Kontraktion deutlich erkennen.

Die kumulierte Zugabe erfolgte in 45-minütigen Abständen. Die Pfeile stellen den Einspritzzeitpunkt dar.

4.1.2 Wirkung von SWS95HCl auf die Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Um aussagekräftige Ergebnisse über die Wirkung von SWS95HCl an der Arteria pulmonalis zu erhalten, wurden wieder vier Versuche durchgeführt.

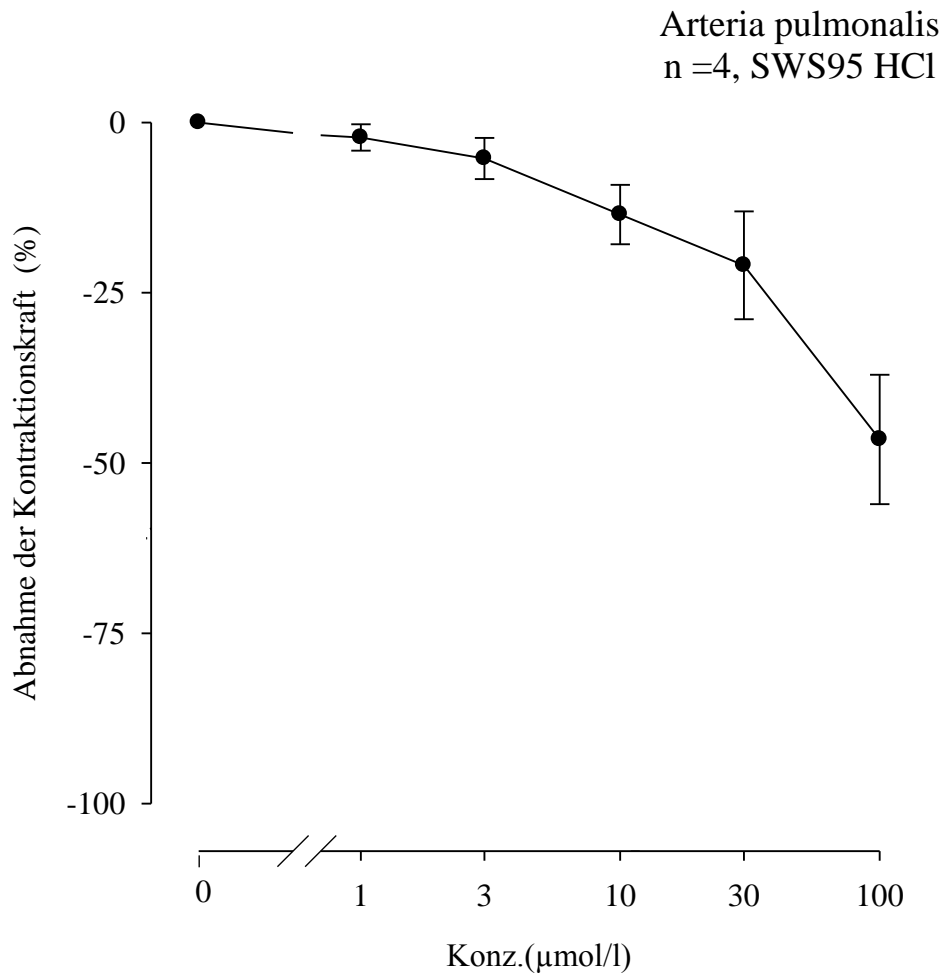
Im Allgemeinen konnte eine leichte Abnahme der Kontraktionskraft beobachtet werden, die sich ab einer Badkonzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ zunehmend verstärkte. Dennoch wurde mit der Substanz kein EC_{50} -Wert erreicht.

In der folgenden Tabelle sind die errechneten Mittelwerte und Standardfehler, sowohl in mN als auch in Prozent, zusammengefasst. n gibt die Anzahl der Versuche an und P die Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tabelle 6: Versuchsergebnisse von SWS95HCl an der Pulmonalarterie

SWS95HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	9,68 \pm 1,25	0 \pm 0	4	...
1	9,36 \pm 1,08	-2,21 \pm 1,93	4	n.s.
3	9,04 \pm 1,06	-5,30 \pm 3,02	4	n.s.
10	8,43 \pm 1,08	-13,51 \pm 4,36	4	0,05
30	7,15 \pm 1,34	-21,98 \pm 7,91	4	0,05
100	4,75 \pm 1,16	-46,54 \pm 9,50	4	0,01

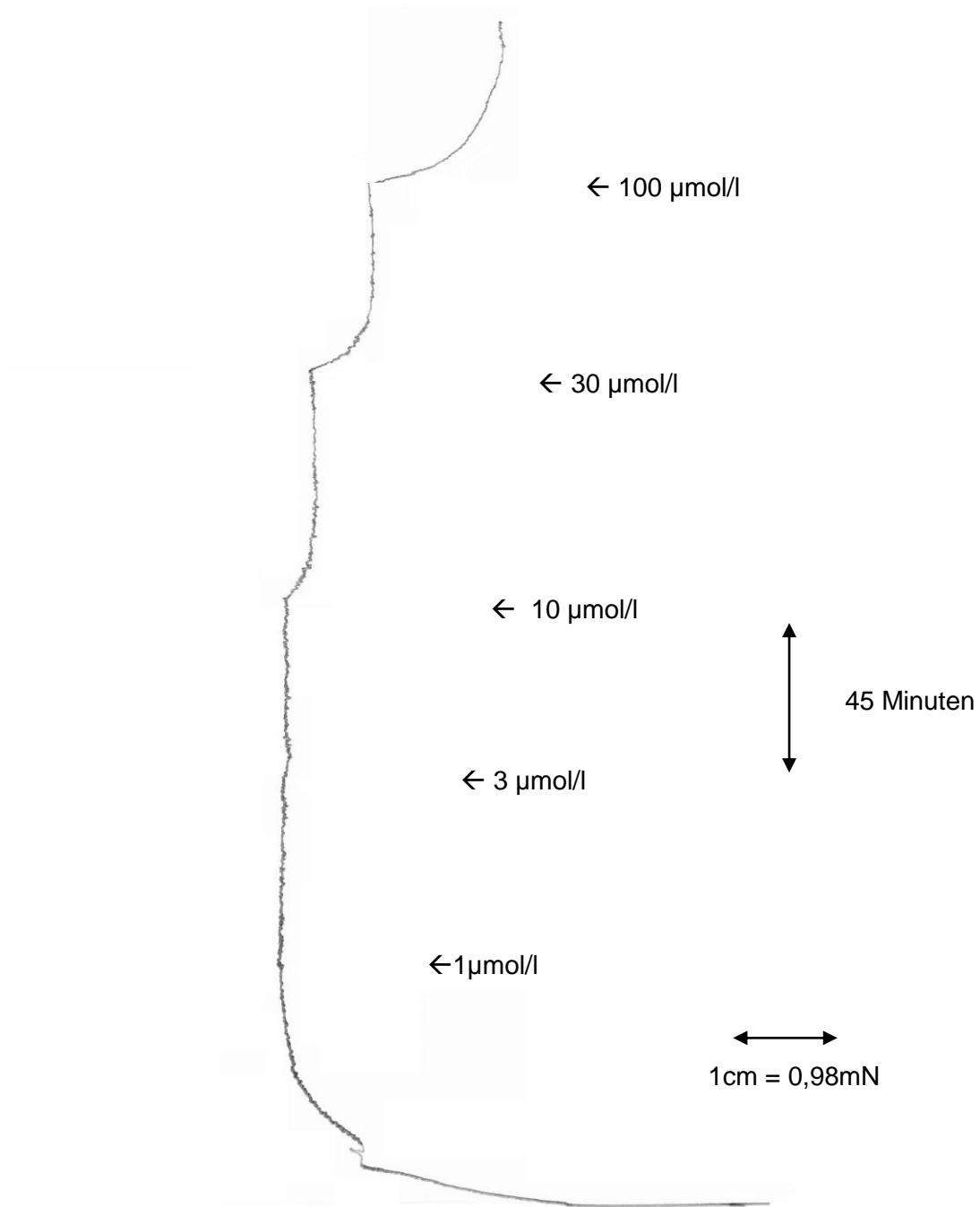
Diagramm 2: Konzentrations- Wirkungskurve von SWS95HCl an der Pulmonalarterie



Dieses Diagramm stellt den Einfluss von SWS95HCl auf die Kontraktionskraft in einer übersichtlichen Kurve dar. Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ aufgetragen, auf der y-Achse ist die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft dargestellt.

Die Substanz bewirkt bei den Konzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$ und 3 $\mu\text{mol/l}$ eine leichte Dilatation der zuvor kontrahierten Pulmonalarterie. Die Kontraktionskraft nimmt in Folge etwas stärker ab, bis sie zu einer signifikanten Dilatation ab 30 $\mu\text{mol/l}$ führt. Man kann klar erkennen, dass sich die Kontraktionskraft bei 100 $\mu\text{mol/l}$ deutlich vom Ausgangswert unterscheidet. Trotzdem konnte als Ergebnis dieser Versuchsreihe an der Pulmonalarterie kein EC_{50} -Wert festgestellt werden.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der Abnahme der Kontraktionskraft durch SWS95HCl an der Pulmonalarterie



Die Originalaufzeichnung stellt den Kurvenverlauf des Schreibers unter der Wirkung von SWS95HCl an der Arteria pulmonalis dar. Hier ist die Abnahme der Kontraktionskraft noch einmal zu beobachten.

Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Substanzzugabe, die Abstände dazwischen geben einen zeitlichen Rhythmus von 45 Minuten an.

4.1.3 Wirkung von SWS95HCl auf die Schlagfrequenz des rechten Vorhofs

Die Ergebnisse hinsichtlich einer Änderung in der Schlagfrequenz des rechten Vorhofes durch SWS95HCl wurden in vier Versuchsreihen ermittelt. Der Kontrollwert wurde, wie bereits bei den vorangegangenen Experimenten, durch Berechnung des Mittelwertes festgestellt. In diesem Fall betrug der Ausgangswert $166,25 \pm 22,49$ Schläge pro Minute. Die Chronotropie wurde durch die Einwirkung der Testsubstanz entscheidend beeinflusst, es kam zu einer signifikanten Abnahme der Schlagfrequenz.

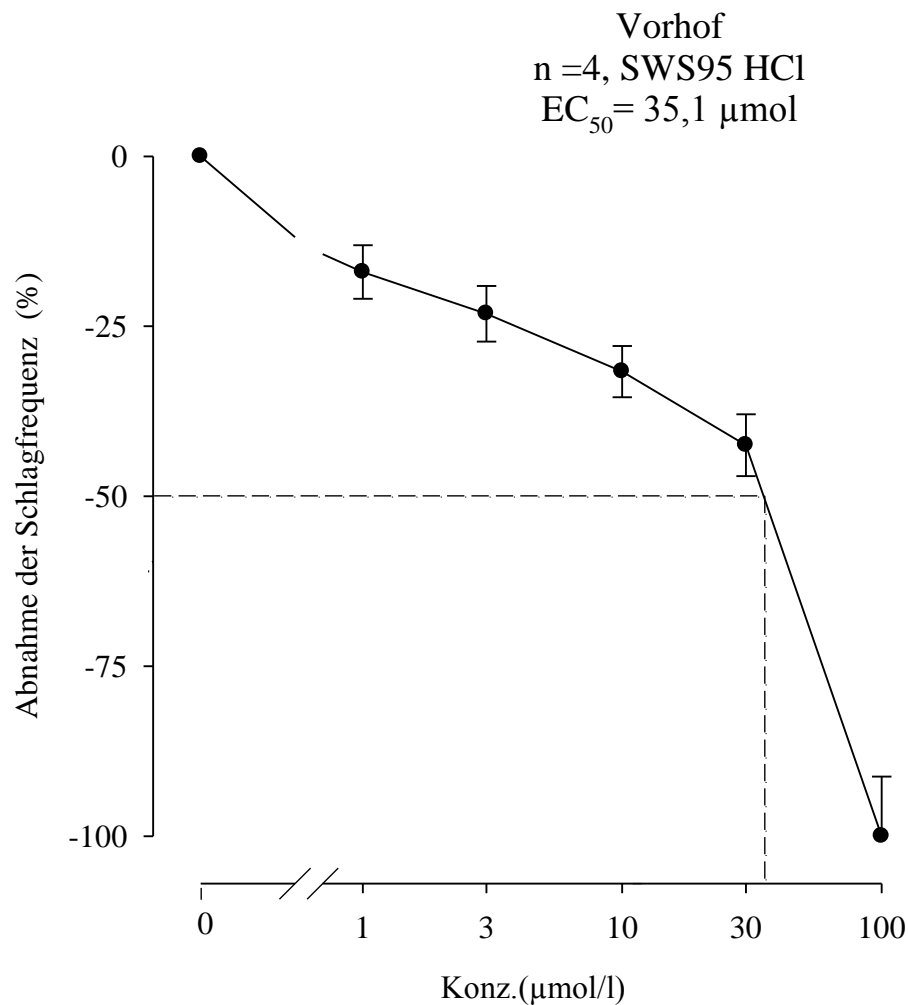
Tabelle 7: Versuchsergebnisse von SWS95HCl am Vorhof

SWS95HCl μmol/l	f ± SEM (x/min)	f ± SEM (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$166,25 \pm 22,49$	0 ± 0	4	---
1	$138,75 \pm 18,53$	$-16,33 \pm 3,94$	4	0,05
3	$127,50 \pm 16,39$	$-22,83 \pm 4,10$	4	0,05
10	$113,75 \pm 15,19$	$-31,30 \pm 3,77$	4	0,01
30	$97,50 \pm 17,62$	$-42,47 \pm 4,54$	4	0,01
100	$17,50 \pm 17,50$	$-91,25 \pm 8,75$	4	0,001

Die Tabelle zeigt neben der Anzahl der Versuche (n) und der Irrtumswahrscheinlichkeit (P), die Mittelwerte (f) und die Standardabweichung (SEM). Die beiden zuletzt genannten Größen wurden prozentuell aufgelistet. Die Anzahl der Schläge wurden ebenfalls angegeben.

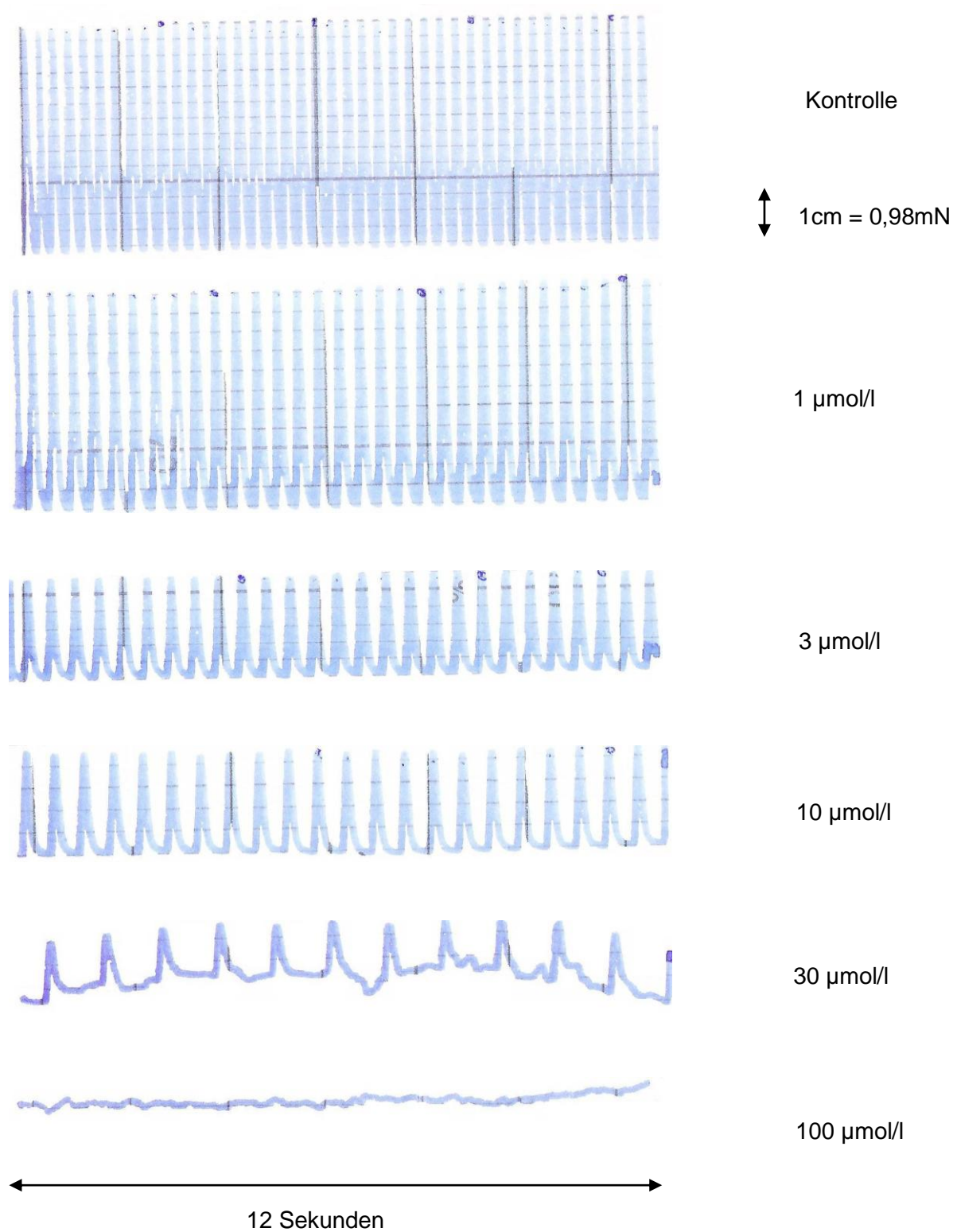
Die Messungen erfolgten bei Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 100 μmol/l.

Diagramm 3: Konzentrations- Wirkungskurve von SWS95HCl am rechten Vorhof



In dieser Graphik ist die Abnahme der Schlagfrequenz deutlich ersichtlich. Eine negativ chronotrope Wirkung konnte bereits bei der Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ signifikant erzielt werden. Bei den folgenden Wirkstoffkonzentrationen ist eine zwar nicht so starke, aber dafür konstante Abnahme zu beobachten. Die effektive Wirkung wurde ab 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Hier sieht man eine steile Abnahme der Chronotropie. Aufgrund der starken Wirkung von SWS95HCl auf den rechten Vorhof konnte ein EC_{50} -Wert von 35,1 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der chronotropen Wirkung von SWS95HCl auf den rechten Vorhof



In der Aufzeichnung ist die negative chronotrope Wirkung der Testsubstanz an der abnehmenden Anzahl der Amplituden proportional zur Konzentrationserhöhung zu erkennen.

4.1.4 Wirkung von SWS95HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta

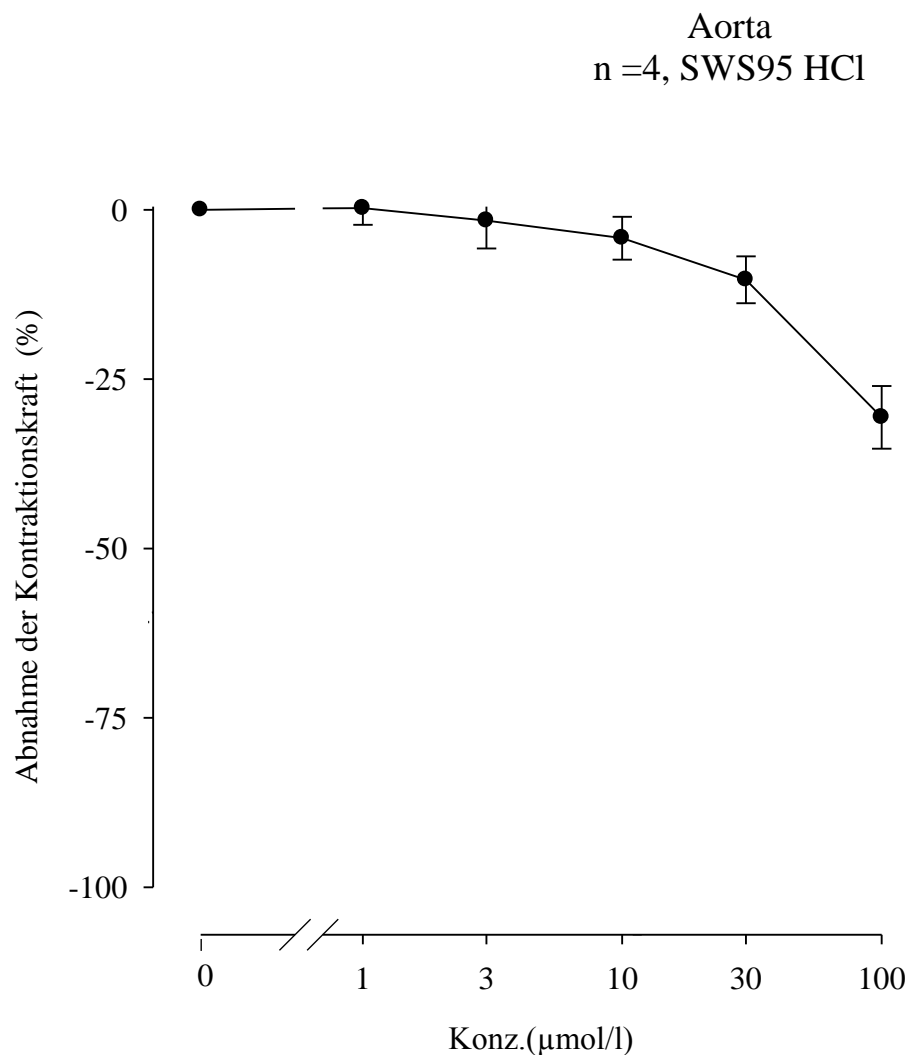
Eine mögliche vasodilatierende Wirkung von SWS95HCl auf die glatte Muskulatur der Aorta descendens wurde getestet, indem vier Versuche an ringförmig geschnittenen Aortenstücken vermessen wurden. Der Kontrollwert wurde wie gewohnt ermittelt und ergab $9,24 \pm 1,16$ mN. Nach dem Durchlauf aller Konzentrationsstufen, stellte sich der Einfluss der Testsubstanz, bezogen auf die Abnahme der Kontraktionskraft als gering heraus. Erst nach der letzten Substanzzugabe kam es zum signifikanten Abfall, welcher in der Konzentrations-Wirkungskurve (siehe Diagramm 4) gut ersichtlich ist. Daher konnte die Konzentration, bei der es um die Hälfte zur Abnahme der Kontraktionskraft kommt, nicht erfasst werden.

Tabelle 8: Versuchsergebnisse von SWS95HCl an der Aorta

SWS95HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$9,24 \pm 1,16$	0 ± 0	4	---
1	$9,31 \pm 1,34$	$-0,02 \pm 2,47$	4	n.s.
3	$9,24 \pm 1,41$	$-0,17 \pm 4,11$	4	n.s.
10	$9,14 \pm 1,32$	$-0,77 \pm 3,17$	4	n.s.
30	$8,60 \pm 1,24$	$-7,54 \pm 3,47$	4	n.s.
100	$6,84 \pm 1,07$	$-26,64 \pm 4,62$	4	0,05

Diese Tabelle veranschaulicht die Anzahl der durchgeführten Versuch n, sowie die gemessene Irrtumswahrscheinlichkeit P und die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen in mN und Prozent.

Diagramm 4: Konzentrations- Wirkungskurve von SWS95HCl an der Aorta

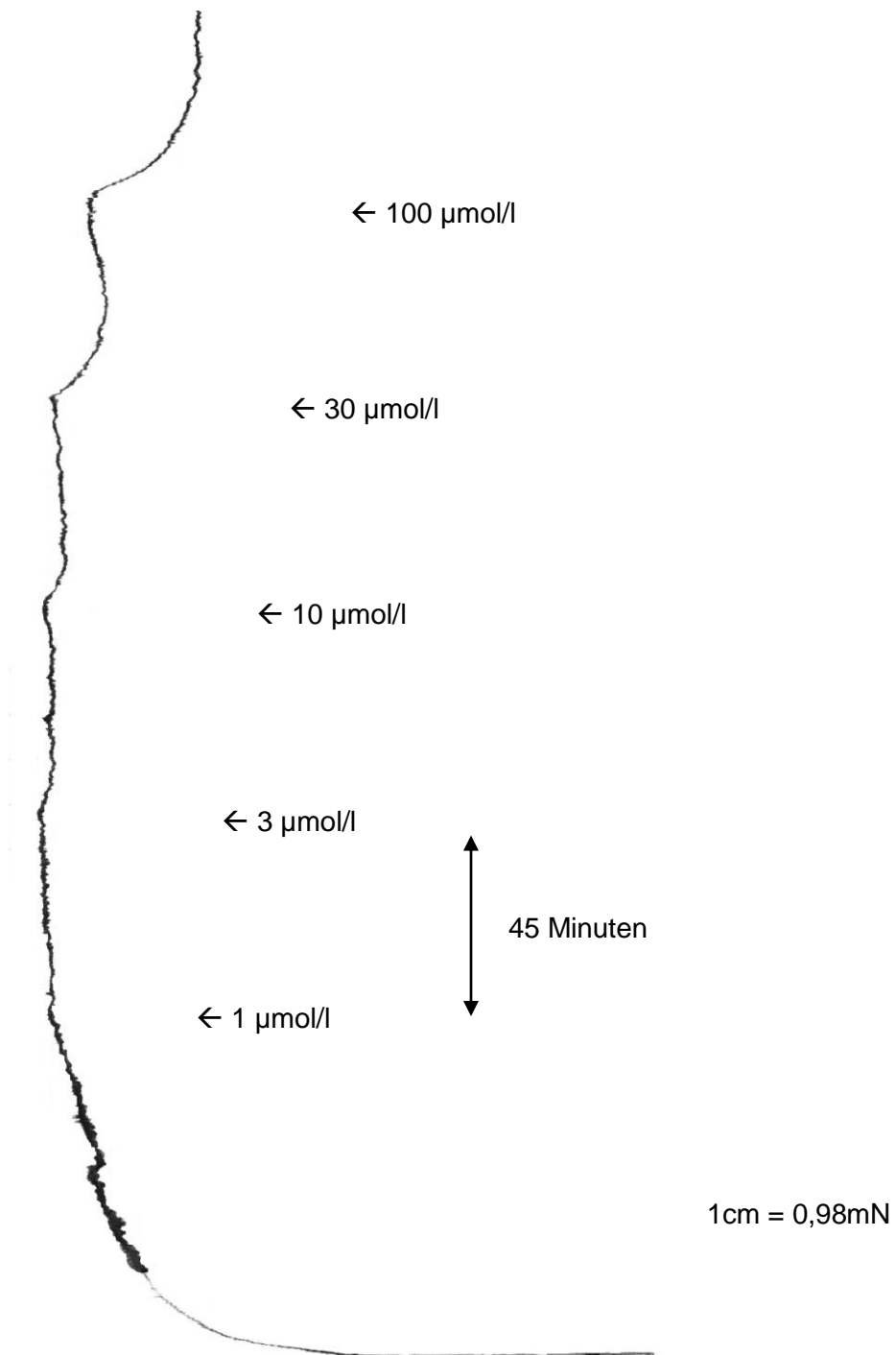


Aus dieser Darstellung geht eindeutig hervor, dass die Wirkung der zu testenden Substanz eher schwach ausfällt, sodass kein EC_{50} -Wert erreicht wurde.

Die Abnahme der Kontraktionskraft ist bei den geringen Wirkstoffkonzentrationen bis 30 µmol/l lediglich gering. Dieser Umstand weist darauf hin, dass die glatte Muskulatur der Aorta nur wenig dilatiert wurde. Auffällig ist, dass es bei einer Konzentration von 100 µmol/l zu einer stärkeren Kontraktionsabnahme kam.

Die Abszisse gibt die Zunahme der Konzentration in µmol/l an und die Ordinate die prozentuelle Abnahme der Kontraktionskraft.

Abbildung 17: Originalaufzeichnung der dilatierenden Wirkung von SWS95HCl auf die Aorta



Die vom Flachbettschreiber dokumentierte Aufzeichnung bestätigt, dass die Testsubstanz nur eine geringe vasodilatierende Wirkung auf die Aorta aufweist.

4.1.5 Wirkung von SWS95HCl auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

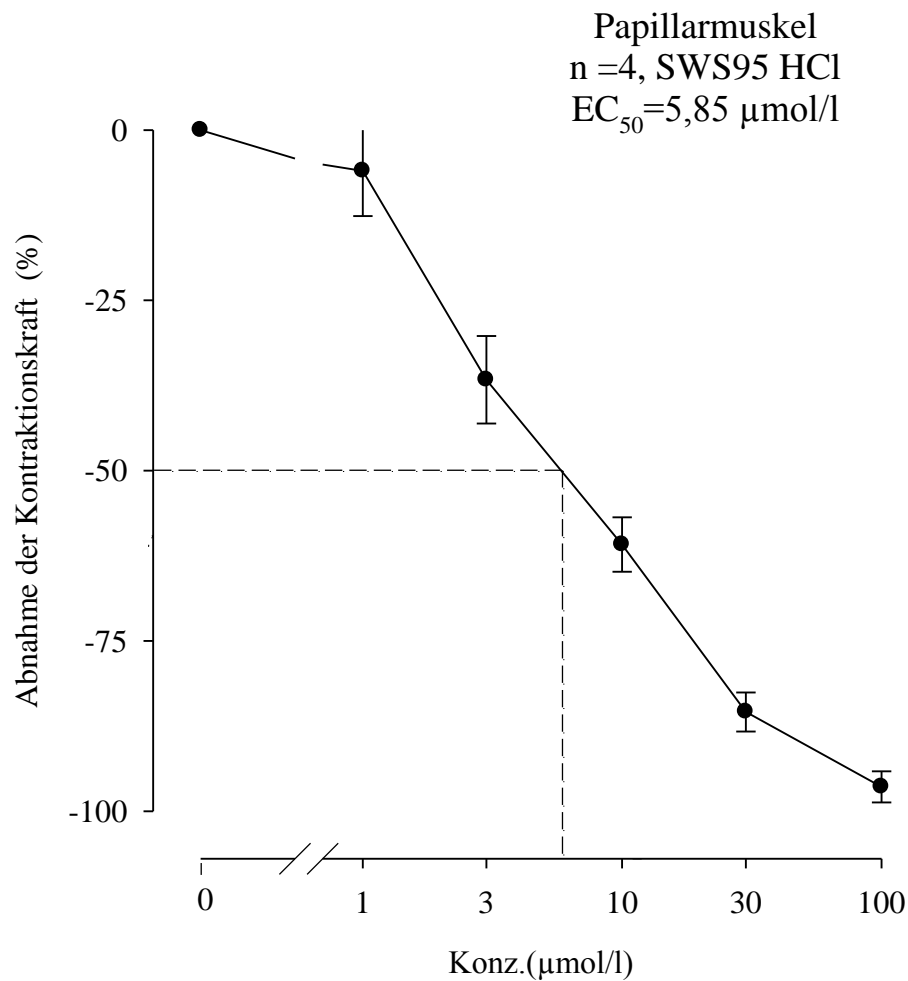
Eine negativ oder positiv inotrope Wirkung auf die Schlagkraft des Papillarmuskels wurde mit Hilfe der Durchführung von vier Versuchen getestet. Nachdem die Anpassungsphase des Organpräparats durchlaufen und die Schlagkraft konstant war, wurde der Kontrollwert $1,23 \pm 0,09$ mN rechnerisch ermittelt. Anschließend wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen. Es zeigte sich relativ schnell, bereits ab einer Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$, dass SWS95HCl in der Lage war, die Inotropie bedeutsam zu beeinflussen. Dies ließ erahnen, dass die folgenden Konzentrationsstufen ebenfalls zu einer negativ inotropen Wirkung führen würden. Von der ersten Konzentrationszugabe bis zur Letzten wurde eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft des Papillarmuskels verzeichnet.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche am Papillarmuskel verzeichnet: die Mittelwerte (f_c) samt ihrer Standardfehler (SEM), welche in mN und Prozent aufgelistet sind, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) und die Anzahl der Versuche (n).

Tabelle 9: Versuchsergebnisse von SWS95HCl am Papillarmuskel

SWS95HCl $\mu\text{mol/l}$	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	$1,23 \pm 0,09$	0 ± 0	4	---
1	$1,14 \pm 0,13$	$-6,93 \pm 6,62$	4	n.s.
3	$0,83 \pm 0,12$	$-32,62 \pm 6,43$	4	0,01
10	$0,49 \pm 0,07$	$-59,59 \pm 4,00$	4	0,01
30	$0,19 \pm 0,05$	$-85,27 \pm 2,87$	4	0,001
100	$0,05 \pm 0,03$	$-96,07 \pm 2,29$	4	0,001

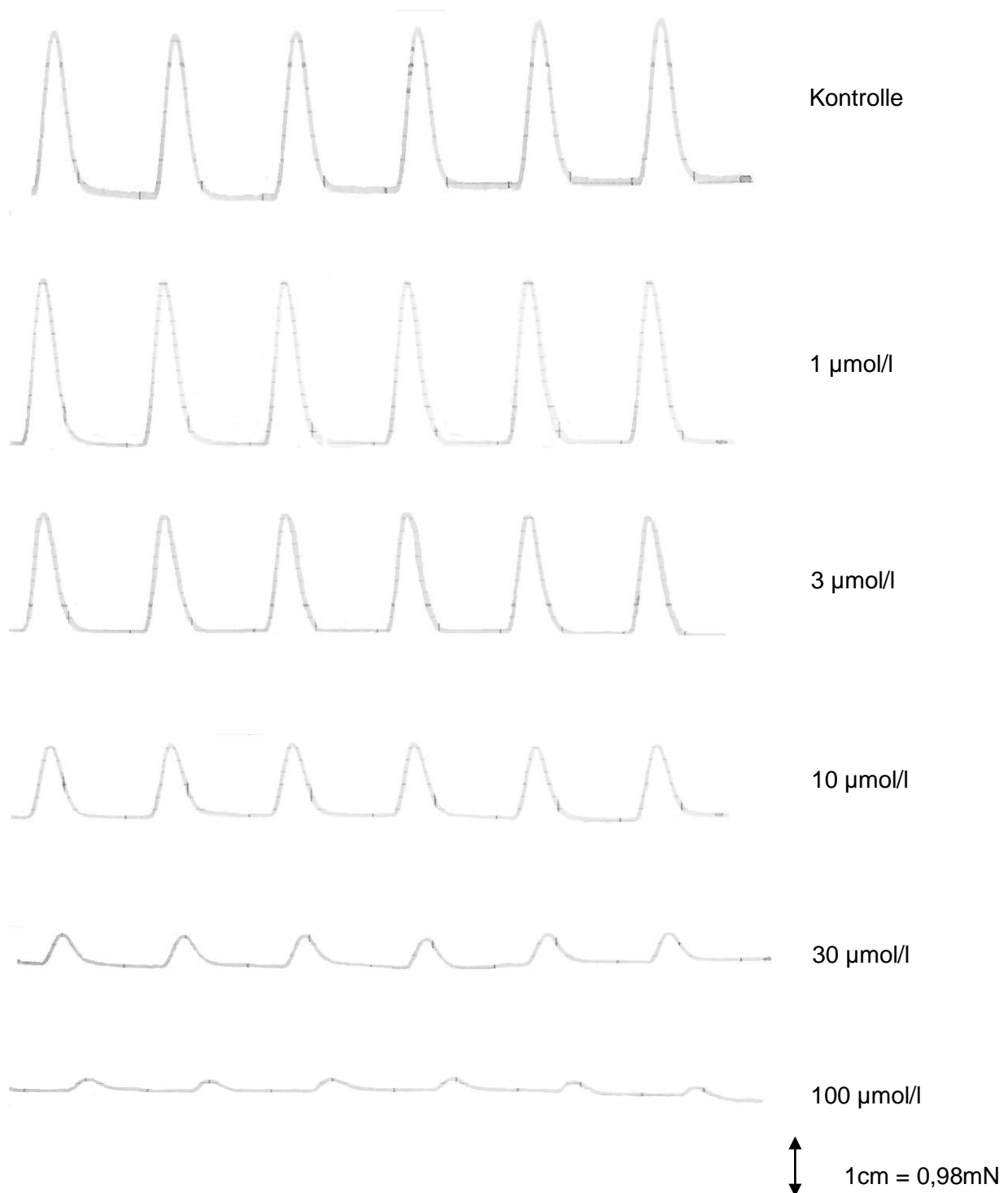
Diagramm 5: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS95HCl am Papillarmuskel



Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigt, dass es bereits bei $1 \mu\text{mol/l}$ zu einer signifikanten Abnahme der Schlagkraft kam. Die Testsubstanz erreichte bei einer Konzentration von $5,85 \mu\text{mol/l}$ den EC_{50} -Wert. Somit kann SWS95HCl als stark negativ inotrop wirkende Substanz bezeichnet werden.

Auf der x-Achse ist die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ logarithmisch aufgetragen, während an der y-Achse die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent abzulesen ist. Die Punkte geben die Standardfehler an und die sie durchziehenden Striche markieren die Streuung. Je kleiner die Striche, desto geringer ist auch die Streuung.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der inotropen Wirkung von SWS95HCl auf den Papillarmuskel



In der Aufzeichnung wird die inotrope Wirkung signifikant durch die kontinuierliche Abnahme der Amplitudenlänge dargestellt. Bei einer Substanzkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ waren die Amplituden kaum noch oder nicht mehr zu vermessen.

4.2 Untersuchung des Wirkmechanismus von SWS95HCl am terminalen Ileum

Da es bei der Untersuchung der Wirkung von SWS95 auf das terminale Ileum zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft kam, wurde in Folge der Wirkmechanismus durch die Zugabe von Glibenclamid genauer erforscht.

4.2.1 Effekt von SWS95HCl unter dem Einfluss von Glibenclamid 30 $\mu\text{mol/l}$

Die Versuchsreihen wurden durchgeführt, um zu testen, ob der Kaliumkanalblocker Glibenclamid in der Lage ist, die Wirkung von SWS95HCl zu antagonisieren. Somit würde der Wirkmechanismus nicht über die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle erklärt werden können.

Der Ablauf der Versuche wurde bereits im Kapitel 3.5.8 näher erläutert.

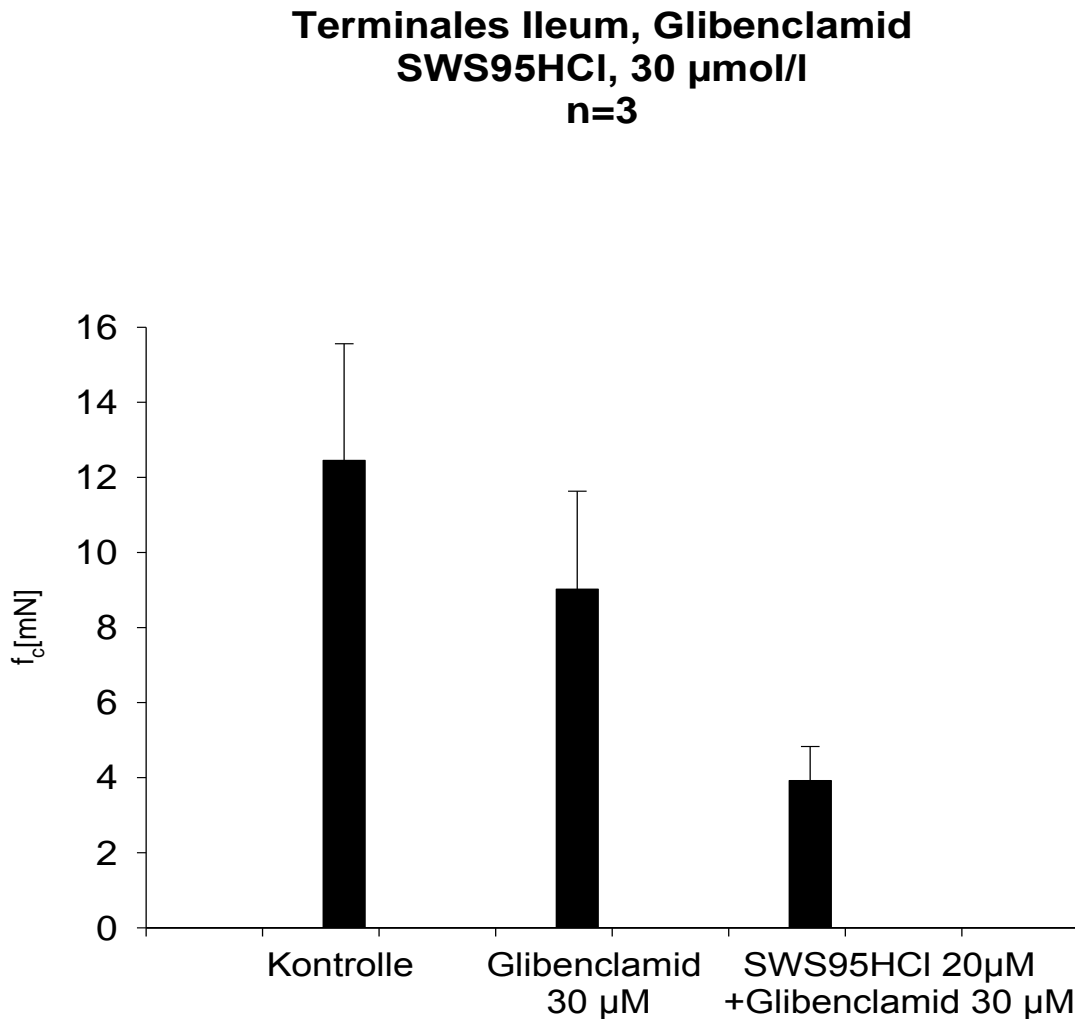
Nach der maximalen Kontraktion mit Hilfe der Kaliumchlorid-Lösung wurde ein Kontrollwert von $12,45 \pm 3,11$ mN erreicht. Anschließend wurde zuerst 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und nach 45-minütiger Anpassungszeit SWS95HCl in einer Konzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt. Dieser Wert entsprach der ermittelten EC_{50} -Konzentration der Testsubstanz.

Tabelle 10: Ergebnisse Wirkmechanismus mit 30 µl Glibenclamid auf das terminale Ileum

Konzentration (µmol/l)	f_c ± SEM (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	12,25±3,11	3	---
30 µmol Glibenclamid	8,86±2,61	3	---
+ 20 µmol SWS95HCl	3,85±0,91	3	0,05

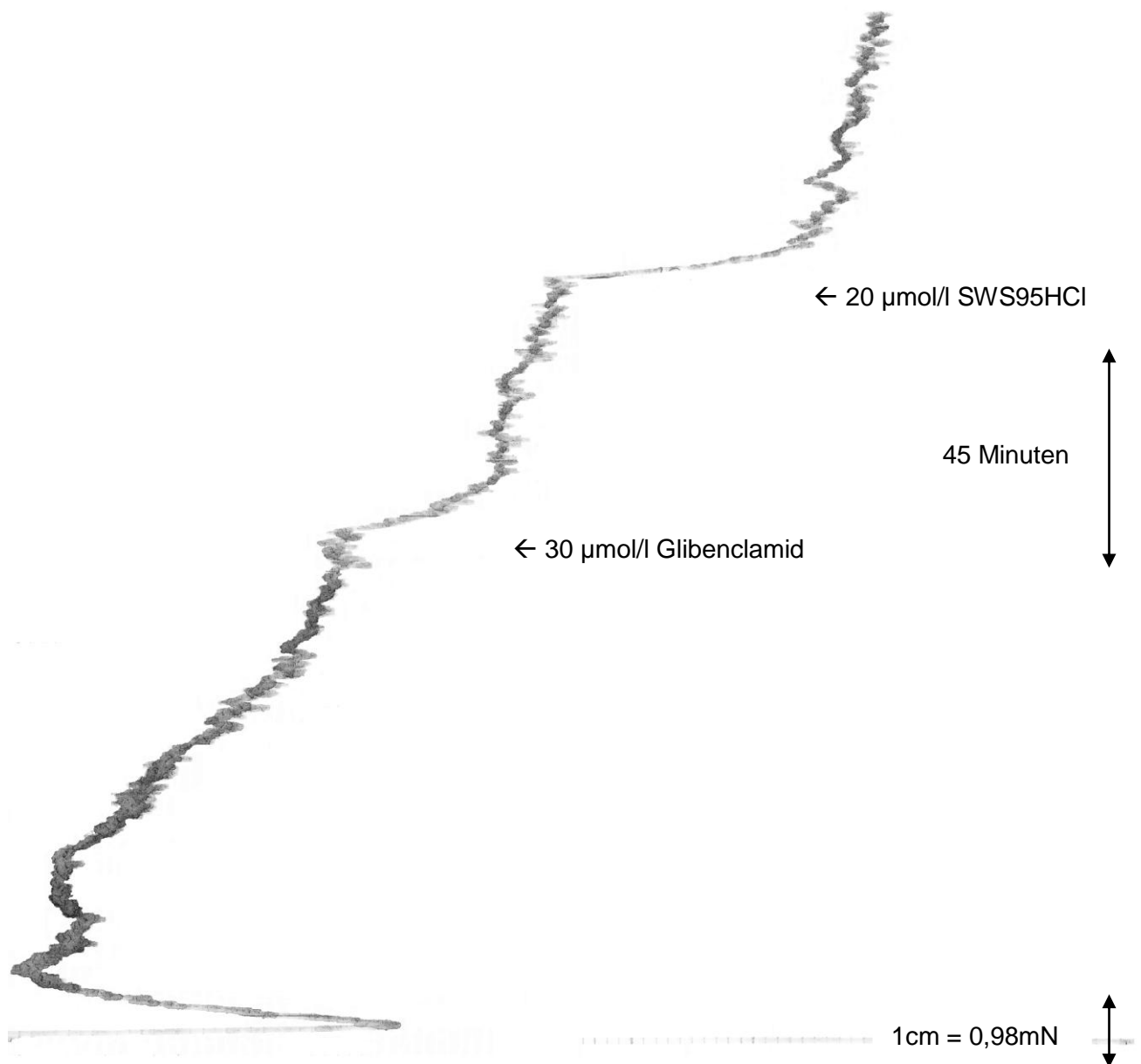
Die Tabelle führt die arithmetischen Mittelwerte inklusive Standardfehler in der Einheit mN an. Weiters ist daraus ersichtlich, dass jeweils drei Versuche mit der Zugabe von 30 µl Glibenclamid am terminalen Ileum durchgeführt wurden und welche Irrtumswahrscheinlichkeiten sich dabei ergaben.

Diagramm 6: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse in einem Balkendiagramm



Die Abszisse veranschaulicht die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in $\mu\text{mol/l}$, während die Ordinate die Kontraktionskraft in mN darstellt. Der erste Balken der Abbildung symbolisiert die Kontrolle, die beiden anderen stellen die Abnahme der Kontraktionskraft, zum einen durch die Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ und zum anderen durch Kombination von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 20 $\mu\text{mol/l}$ der Testsubstanz, dar. Die Balken ergeben sich aus der Bildung der Mittelwerte aus den drei Versuchsreihen und die strichförmigen Verlängerungen markieren die Standardabweichungen.

Abbildung 19: Originalaufzeichnung des Versuchs mit Glibenclamid am terminalen Ileum



Die Abbildung zeigt die vom Schreiber dokumentierte Veränderung der Kontraktionskraft nach Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen.

Nach der Zugabe von 30 µmol/l Glibenclamid kam es zu einer messbaren Abnahme der Kontraktion um 28 %. Die Zufuhr von 20 µmol/l der Testsubstanz erzielte eine wiederholte Relaxation um 40 %. Daraus ist zu schließen, dass die Beteiligung von Glibenclamid die Wirkung von SWS95HCl abschwächt. Es kam sogar zu einer verminderten vasodilatierenden Wirkung um 10 %, verglichen mit den Versuchsreihen ohne Glibenclamid bei gleicher Konzentration der Testsubstanz.

4.2.2 Effekt von SWS95HCl unter dem Einfluss von Glibenclamid 100µmol/l

In drei Versuchen wurde ermittelt, ob die Wirkung von SWS95HCl durch die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle, trotz der Zugabe des Kaliumkanalblockers Glibenclamid, zu Stande kommt. Der Antagonist wurde jeweils in der Konzentration von 100 µmol/l zugesetzt.

Die Versuchsreihen wurden analog zu den Versuchen mit 30 µmol/l Glibenclamid durchgeführt. Nachdem das terminale Ileum maximal kontrahiert wurde, wurden 100 µmol/l des Antagonisten ins Organbad zugespritzt. Dadurch kam es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft um 59 %. Nach 45 Minuten folgte die Zugabe von SWS95HCl in einer Konzentration von 20 µmol/l, was dem gerundeten EC_{50} -Wert entsprach. Dies bewirkte eine Kontraktionsabnahme um 92,5 % bezogen auf den Kontrollwert und damit eine signifikante Gefäßerweiterung des Organs.

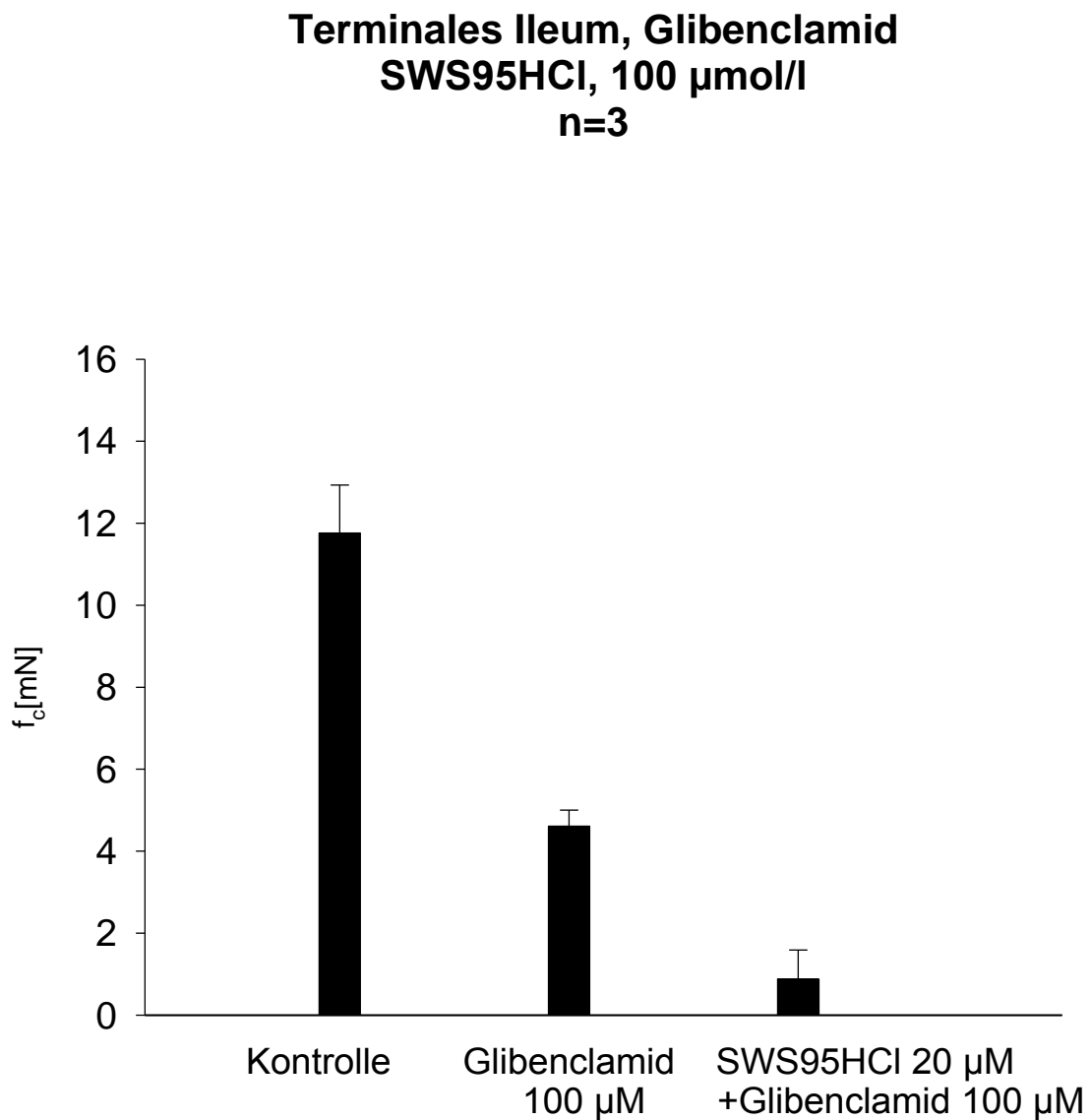
Die Zugabe von Glibenclamid in 100 µmol/l beeinflusste die Wirkung von SWS95HCl dahingehend, dass daraus die Annahme resultiert, die ATP-abhängigen Kaliumkanäle spielen bei der Erforschung des Wirkmechanismus lediglich eine untergeordnete Rolle. In diesen Versuchen schwächte der Antagonist die Aktivität der Testsubstanz bei einer Konzentration von 20 µmol/l, im Vergleich zu den Versuchen bei der gleichen Konzentration SWS95HCl, jedoch ohne Zugabe von Glibenclamid, um 17,5 % ab.

Tabelle 11: Ergebnisse Wirkmechanismus mit 100 µl Glibenclamid auf das terminale Ileum

Konzentration (µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)
Kontrolle	12,67±1,17	3	---
100 µmol Glibenclamid	4,75±0,39	3	---
+ 20 µmol SWS95HCl	0,23±0,70	3	0,05

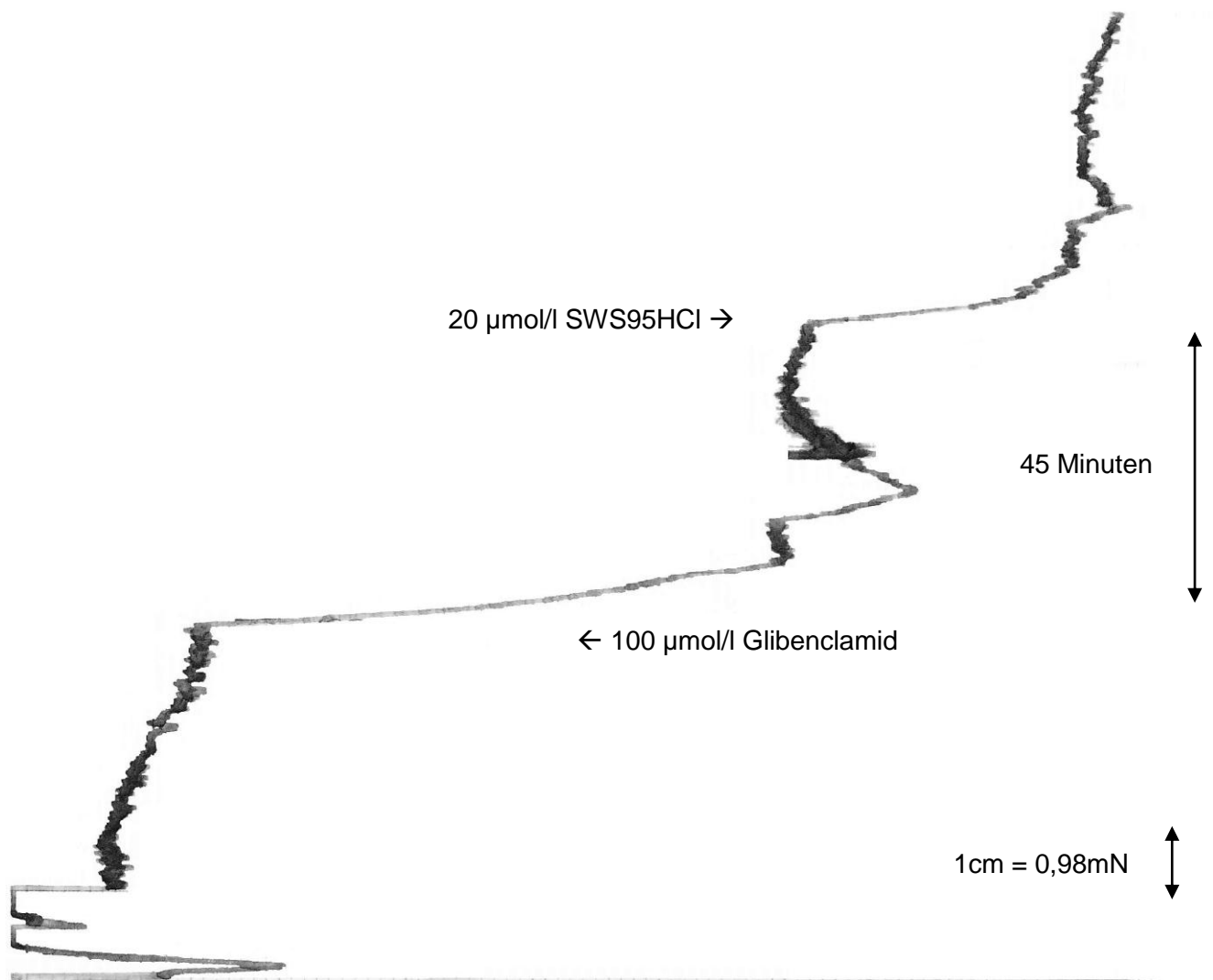
In der Tabelle sind die aus den drei Versuchen ermittelten arithmetischen Mittelwerte sowie deren Standardfehler in der Kontrollphase, der Glibenclamidphase und der Glibenclamid-Testsubstanzphase in mN dargestellt.

Diagramm 7: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse in einem Balkendiagramm



In diesem Diagramm wurden auf der x-Achse die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in μ mol/l und auf der y-Achse die Kontraktionskraft in mN aufgetragen. Die Balken zeigen die Wirkung von 100 μ mol Glibenclamid und der anschließend zugefügten 20 μ mol SWS95HCl im Vergleich zur Kontrolle. Die dünnen Striche über den Balken symbolisieren die Standardabweichungen.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung des Versuchs mit Glibenclamid am terminalen Ileum



Die Originalaufzeichnung bestätigt den Effekt des Antagonisten Glibenclamid und die daraus resultierende Wirkung der Testsubstanz auf das glattmuskuläre Organ. Es kam zu einer starken Vasodilatation des Darms durch beide Substanzen.

Die Pfeile markieren die Zugabe der einzelnen Substanzen in 45-minütigen Abständen.

5. Diskussion

5.1 Allgemeines

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Wirkung der neu synthetisierten Substanz SWS95HCl an den isolierten Organen des Meerschweinchens zu testen. Zur Untersuchung wurden sowohl Herzmuskelpräparate als auch glattmuskuläre Organe herangezogen. Die genaue Durchführung dieser Versuchsreihen, sowie deren Auswertungen wurden im Kapitel 4 übersichtlich dargestellt und beschrieben. Dieses Kapitel widmet sich nun der Bewertung und Gegenüberstellung der ermittelten Daten.

5.2 Wirkung auf die Herzmuskulatur

Zu den Herzmuskelpräparaten zählen der rechte Vorhof und der Papillarmuskel. In jeweils vier Versuchsreihen galt es den Effekt der Testsubstanz zu ermitteln. Es wurde untersucht, ob es beim Vorhof zu einer Veränderung der Schlagfrequenz bzw. beim Papillarmuskel zu einer Veränderung der Kontraktionskraft kommt. Bei beiden Organen trat eine effektive Wirkung ein, sodass jeweils ein aussagekräftiger EC_{50} -Wert ermittelt werden konnte. Beim rechten Vorhof lag dieser Wert bei $35,1 \mu\text{mol/l}$, während der Papillarmuskel einen EC_{50} -Wert von geringen $5,85 \mu\text{mol/l}$ erreichte. Folglich kann die Wirkung von SWS95HCl auf den Papillarmuskel, im Vergleich zum rechten Vorhof, als signifikanter bezeichnet werden.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen zeigten, dass es sich bei SWS95HCl um eine Substanz handelt, die eine ausgeprägte Wirkung auf beide Herzmuskelpräparate aufweist. Beim Vorhof ließ sich eine negative chronotrope Wirkung erkennen, was sich an der abnehmenden Anzahl der Amplituden bei gleichzeitiger Konzentrationserhöhung zeigte. Die Einwirkung von SWS95HCl in unterschiedlichen Konzentrationen auf den Papillarmuskel führte zu einem negativ inotropen Effekt, das heißt zu einer Abnahme der Kontraktionskraft.

Aus der nachfolgenden Tabelle lassen sich die Unterschiede in der Wirkung auf beide Organe deutlich erkennen.

Tabelle 12: Wirkung auf Organpräparate mit quergestreifter Muskulatur

Organpräparat	SWS95HCl fc(%) ± SEM bei 100 µmol/l	EC₅₀ (µmol/l)
Rechter Vorhof	-91,25 ±8,75	35,1
Papillarmuskel	-96,07 ±2,27	5,85

Die Wirkung von SWS95HCl auf den Vorhof und den Papillarmuskel war so effektiv, dass die Kontraktionskraft bei einer Badkonzentration von 100 µmol/l bei 0 % bzw. annähernd bei 0 % lag.

5.2.1 Wirkung auf den rechten Vorhof

Die Versuche am rechten Vorhof lieferten statistisch höchst signifikante Ergebnisse. Zu Beginn der Versuchsreihen wurde ein Kontrollwert von 166,25±22,49 Schläge pro Minute ermittelt. Durch die weiteren Substanzzugaben in zunehmenden Konzentrationen folgte eine stetige Abnahme der Chronotropie, bis schließlich bei einer Konzentration von 100 µmol/l keine Schläge mehr gezählt werden konnten. Die Schlagfrequenz des Vorhofs wurde ab einer Konzentration von 1 µmol/l deutlich beeinflusst. Da die Substanz bei der Endkonzentration stark negativ chronotrop wirkte, gestaltete sich die Auswertung in den meisten Fällen als schwierig. In drei Fällen kam es sogar zum frühzeitigen Absterben der Organe.

5.2.2 Wirkung auf den Papillarmuskel

Wie bereits erwähnt, war der EC₅₀-Wert bei den Papillarmuskelpräparaten am niedrigsten. Aus diesem Grund war die Wirkung der Testsubstanz an diesen Organen am Effektivsten. Auffallend war, dass es ab einer Konzentration von 3 µmol/l im Organbad zu einer bemerkenswerten Abnahme der Schlagkraft kam. Die Schlagkraft des Papillarmuskels lag vor Beginn der Substanzzugabe bei 1,23±0,09 mN. Ausgehend von diesem Kontrollwert wurde eine signifikante Abnahme der Inotropie beobachtet. Beim Endwert wurde eine Amplitude von 0,05±0,03 mN festgestellt. Daraus ist zu schließen, dass die Substanz bereits in geringen Konzentrationen eine starke Wirkung erzielt.

5.3 Wirkung auf glattnuskuläre Organe

Im Vergleich zu den Herzmuskelpräparaten konnten bei den glattnuskulären Organen deutlich weniger aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden. Das terminale Ileum ist davon ausgenommen. Es war das einzige glattnuskuläre Organ, bei dem ein EC_{50} -Wert von 15,86 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde. Bei der Aorta und an der Pulmonalarterie konnte hingegen keine signifikante Wirkung durch SWS95HCl nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Wirkung auf Organpräparate mit glatter Muskulatur

Organpräparat	SWSHCl Fc(%) \pm SEM 100 $\mu\text{mol/l}$	EC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Aorta	-26,64 \pm 4,62	>100
Pulmonalarterie	-52,45 \pm 9,50	>100
Darm	-110,98 \pm 5,50	15,86

In der Tabelle ist die Gegenüberstellung der glattnuskulären Organe Aorta, Pulmonalarterie und Darm dargestellt. Daraus kann man deutliche Unterschiede in ihrer Wirkung ablesen.

5.3.1 Wirkung auf die Aorta

Die Testsubstanz brachte an der Aorta den geringsten Effekt ein. Die Vasodilatation des zuvor kontrahierten Gefäßes verlief nur sehr langsam und es konnte daher kein EC_{50} -Wert festgestellt werden. Die Auswirkungen auf die Aorta waren somit sehr gering. Der Kontrollwert ergab 9,25 \pm 1,16 mN. Aufgrund des geringen dilatierenden Effektes durch SWS95HCl wurde ein Endwert von 6,84 \pm 1,07 mN ermittelt. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ wurde lediglich eine 25-prozentige Abnahme der Kontraktionskraft vermessen.

5.3.2 Wirkung auf die Arteria pulmonalis

Aufgrund der Ergebnisse an der Pulmonalarterie konnte eine signifikante Wirkung ausgeschlossen werden. Die Testsubstanz bewirkte bei beinahe allen Konzentrationen nur einen schwachen vasodilatierenden Effekt. Nur die Endkonzentration erreichte eine Abnahme der Kontraktionskraft, allerdings konnte dennoch kein EC_{50} -Wert bestimmt werden.

5.3.3 Wirkung auf das terminale Ileum

Die Betrachtung der Ergebnisse am terminalen Ileum ergab, dass SWS95HCl eine stark spasmolytisch wirksame Substanz ist. Dies ließ sich vor allem aus der konstant abnehmenden Kontraktion interpretieren, welche schon bei der geringsten Konzentrationsstufe ihren Anfang nahm. Die Testsubstanz erreichte am terminalen Ileum eine maximale Abnahme der Kontraktion, noch bevor die Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ erreicht war. Der EC_{50} -Wert konnte wieder durch zeichnerische Auswertung der Konzentrations-Wirkungskurven errechnet werden und betrug 15,86 $\mu\text{mol/l}$.

Dieser Umstand wurde als Anlass genommen, den Wirkmechanismus der Schwefelwasserstoff freisetzenden Substanz unter Zugabe von Glibenclamid am terminalen Ileum genauer zu erforschen.

Es wurde in Erwägung gezogen, dass die starke spasmolytische Aktivität mit der Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen im Zusammenhang steht. SWS95HCl ist für die Freisetzung von Schwefelwasserstoff in Zellen verantwortlich, wodurch ATP-abhängige Kaliumkanäle geöffnet werden und in Folge eine Erweiterung von Gefäßen bewirken. Glibenclamid hingegen fungiert als Sulfonylharnstoffderivat als Kaliumkanalblocker. Nach Hemmung der Kaliumkanäle wurde beobachtet, ob der Einfluss von SWS95HCl dennoch gegeben war.

5.3.4 Gemeinsame Wirkung von SWS95HCl und Glibenclamid

Aus den Ergebnissen der mit Glibenclamid in zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführten Versuchsreihen am terminalen Ileum, ist der Schluss zu ziehen, dass der Kaliumkanalblocker Glibenclamid in der Lage war, die Wirkung von SWS95HCl zu vermindern. Bei allen durchgeführten Versuchen mit dem Antagonisten kam es zu einer Abnahme der vasodilatierenden Wirkung im Vergleich zu den Versuchsreihen, die am terminalen Ileum ohne die Einwirkung von Glibenclamid erforscht wurden.

Die Untersuchung des Wirkmechanismus erfolgte, wie bereits mehrmals erwähnt, am terminalen Ileum. Sowohl nach Zugabe von 30 µmol Glibenclamid und der darauffolgenden 20 µmol Testsubstanz als auch nach 100 µmol Glibenclamid, trat eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft ein.

Daraus resultiert die Annahme, dass der Wirkmechanismus von H₂S nicht durch die Beteiligung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle beeinflusst wird. Aus der Abnahme der Aktivität ist zu schließen, dass diese vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Diese These wird durch etliche Studien widerlegt. So wird H₂S im Thieme e-Journal Abstract in niedrigen Konzentrationen als schützendes Antioxidans beschrieben, welches über die Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle der Gefäßmuskelzellen wirkt und somit als Prototyp neuer antihypertensiver Strategien zur Prävention und Therapie herangezogen werden kann (Bielenberg 2011). Ahmad et al. berichten, dass die Zufuhr von exogenen H₂S in der Lage ist, den Blutdruck an Ratten nachweislich zu senken. Eine weitere Studie belegt, dass es nach dem Einsatz des Kaliumkanalblockers Glibenclamid zur Relaxation der glatten Aorta-Muskelzellen gekommen ist, was auf die Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen zurückzuführen ist (Semenykhina et al.).

Möglicherweise sind auch noch andere Wege beteiligt. Die Studie Emmanuele et al. 2011 bestätigt diese Annahme. Sie zeigt, dass ein weiterer Wirkmechanismus von Schwefelwasserstoff über die Aktivierung der Phospholipase A₂ führt. Diese bewirkt die Freisetzung der Arachidonsäure, was anfangs eine Vasokonstriktion gefolgt von einer Vasodilatation vermittelt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Erforschung der Schwefelwasserstoff freisetzenden Testsubstanz SWS95HCl an den isolierten Organen des Meerschweinchens. Die Zielsetzung bestand darin, die Wirkungen der neu synthetisierten Substanz auszutesten und eine Analyse der Ergebnisse vorzunehmen, sowie diese in Folge zu interpretieren.

Dazu wurden einerseits der rechte Vorhof und der Papillarmuskel verwendet, welche beide zur Herzmuskulatur zählen, andererseits als glattmuskuläre Organe die Aorta, Pulmonalarterie und der Darm.

Die täglich frisch entnommenen Organe wurden nach ihrer Isolierung und Präparierung in ein temperiertes und mit Oxymix begastes Organbad eingebracht und durch kumulative Zugabe von 1, 2, 7, 20 und 70 µl der Stammlösung versetzt. Anschließend wurde beobachtet, ob es bei den Versuchsreihen am Darm zu einem spasmolytischen Effekt kam bzw. ob bei der Aorta und Pulmonalarterie eine Ab- oder Zunahme der Kontraktionskraft im Vergleich zum Kontrollwert eintrat. Bei den Versuchen am Papillarmuskel wurde entweder eine negative oder eine positive inotrope Wirkung durch die zu testende Substanz erfasst, während beim rechten Vorhof ein negatives oder positives chronotropes Resultat zu beobachten war. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet. Somit konnten diese in weiterer Folge über Konzentrations-Wirkungskurven ausgewertet werden. Die Wirkung von SWS95HCl war dann auf die unterschiedlichen Organe aussagekräftig, wenn ein EC_{50} -Wert erreicht wurde. Darunter versteht man die mittlere effektive Konzentration des Wirkstoffes in µmol/l, bei der die Hälfte des Ausgangswertes erreicht wird.

SWS95HCl erzielte an den Herzmuskelpräparaten signifikante Wirkungen. Bei den Präparaten am rechten Vorhof wurde ein EC_{50} -Wert von 35,1 µmol/l vermessen und bei den Papillarmuskelpräparaten lag dieser sogar bei niedrigen 5,85 µmol/l. Zusammenfassend konnte demnach festgestellt werden, dass die Substanz SWS95HCl entscheidend auf alle Organe mit quergestreifter Muskulatur wirkt, wobei sich die stärkste Wirkung auf den Papillarmuskel ergab.

Im Vergleich zu den Herzmuskelpräparaten wurde als einziges glattmuskuläres Organ beim Darm ein signifikanter EC_{50} -Wert von 15,86 µmol/l eruiert. Alle anderen

Versuche mit der Testsubstanz, an der Aorta und an den Papillarmuskeln, führten zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen.

SWS95HCl besitzt somit auf die verwendeten Organe deutliche negativ chronotrope, negativ inotrope und spasmolytische Wirkungen.

Da SWS95HCl am terminalen Ileum über eine signifikante Vasodilatation wirkte, wurde die Substanz hinsichtlich des Wirkmechanismus in weiteren Versuchsreihen durch Zugabe des Kaliumkanalblockers Glibenclamid untersucht. Dabei wurde eine Verminderung der Aktivität von SWS95HCl durch Glibenclamid beobachtet, die vermutlich nicht auf der Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle beruhte.

Die genaue Aufklärung des Wirkmechanismus bedarf demnach noch weiterer Untersuchungen.

7 Literaturverzeichnis

Ahmad F, Sattar M, Rathore H, Abdullah M, Tan S, Abdullah N, Johns E (2012) Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) reduces blood pressure and prevents the progression of diabetic nephropathy in spontaneously hypertensive rats, 34:203-10

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2005) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9.Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München

Bucci M, Papapetropoulos A, Vallecchio V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, Roviezzo F, Brancaleone V, Cirino G (2010) Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 210, 30:1998-2004

Campbell Neil A, Jane B. Reece (2003) Biologie, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin

Ehlers Eberhard (2003) Chemie 1 Kurzlehrbuch Allgemeine und anorganische Chemie, 8.Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart

Hermann P.T. Ammon (2004) Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, 9. Auflage, GmbH & Co. KG, Berlin

Jens Bielenberg (2011) TRP-Kanäle, Hang Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart, GmbH & Co.KG, 32:11-14, DOI: 10.10T5/S-0031-1271316

Kilian Sven (2003) Die Rolle der Kalium-Ionen-Kanäle bei ischämischer Präkonditionierung, Justus Liebig Universität Gießen

Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P, Wink DA, Pagliaro P (2009) Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide, *Biochim Biophys*, 22:173-176

Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel. *Arzneim Forsch* 17:1249-1253

Roberta E, Sorrentino R, Coletta C, Mitidieri E, Rossi A, Vellecco V, Pinto A, Cirrino G, Sorrentino R (2011) Hydrogen sulfide – induced dual vascular effect involves arachidonic acid cascade in rat mesenteric arterial bed, 337:59-64

Semenykhina OM, Fiziol ZH (2011) The effect of hydrogen sulfide on contractile activity of the vascular smooth muscles in rats, 57:3-11

8 Curriculum Vitae

Name: Natalie Enders

Adresse: Florianistrasse 4/2/25 3370 Ybbs an der Donau

E-Mail: natalie.enders@gmx.at

Geburtstag/-ort: 22.07.1986 / Melk (NÖ)

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familie: Vater: Wilhelm Enders
Zimmermann
Mutter: Kunigunde Enders
Kaufmännische Angestellte
Bruder: Markus Enders
Möbeldesigner

Schul Ausbildung: 1992-1996 Volksschule Ybbs an der Donau

1996-2004 Bundesgymnasium in Wieselburg an der Erlauf (NÖ)

Seit 2004 Pharmaziestudium in Wien

März 2011 Beginn der Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien

Praktika: Juli 2004 Apotheke zum Heiligen Geist Ybbs a. d. Donau
August 2005 Lindenapotheke Persenbeug
Juli 2006 Apotheke zum Heiligen Geist Ybbs a. d. Donau
September 2007 Apotheke zum Heiligen Geist Ybbs a. d. Donau
August 2008 Apotheke zum Heiligen Geist Ybbs a. d. Donau
Juli 2009 Apotheke zum Heiligen Geist Ybbs a. d. Donau
Juli 2010 Apotheke zum Heiligen Geist Ybbs a. d. Donau
Seit 2008 geringfügig beschäftigt bei Apotheke zum Heiligen Geist Ybbs a. d. Donau